



**ELIANA FERREIRA PAES**

**DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE  
BIOMOLECULAR PARA DETECÇÃO DE HPV EM  
AMOSTRAS CERVICOUTERINAS: DESCRIÇÃO DO  
MÉTODO E AVALIAÇÃO INICIAL**

***DEVELOPMENT OF A BIOMOLECULAR ASSAY TO  
DETECT HPV IN UTERINE CERVICAL SAMPLES:  
DESCRIPTION OF THE METHOD AND INITIAL  
ASSESSMENT***

**CAMPINAS  
2015**





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Médicas

**ELIANA FERREIRA PAES**

**DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE  
BIOMOLECULAR PARA DETECÇÃO DE HPV EM  
AMOSTRAS CERVICOUTERINAS: DESCRIÇÃO DO  
MÉTODO E AVALIAÇÃO INICIAL**

***DEVELOPMENT OF A BIOMOLECULAR ASSAY TO  
DETECT HPV IN UTERINE CERVICAL SAMPLES:  
DESCRIPTION OF THE METHOD AND INITIAL  
ASSESSMENT***

Dissertação apresentada à Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Ciências da Saúde, área de concentração em Oncologia Ginecológica e Mamária.

*Dissertation submitted to Gynecology and Obstetrics Post-Graduation Program of the Medical Sciences School of the University of Campinas for obtaining the title of Master in Health Sciences in the concentration area Gynecologic Oncology and Breast.*

**ORIENTADOR: PROF. DR. JÚLIO CÉSAR TEIXEIRA**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA  
ALUNA ELIANA FERREIRA PAES E ORIENTADA PELO  
PROF. DR. JÚLIO CÉSAR TEIXEIRA**

Assinatura da Orientador

---

**CAMPINAS  
2015**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

P138d

Paes, Eliana Ferreira, 1976-  
Desenvolvimento de um teste biomolecular para  
detecção de HPV em amostras cervicouterinas :  
descrição do método e avaliação inicial / Eliana Ferreira  
Paes. -- Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador : Júlio César Teixeira.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Reação em cadeia da polimerase multiplex. 2.  
Neoplasia intraepitelial cervical. 3. Neoplasias do colo  
do útero. I. Teixeira, Júlio César, 1965-. II. Universidade  
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.  
III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:**

Development of a biomolecular assay to detect HPV in uterine cervical samples :  
description of the method and initial assessment

**Palavras-chave em inglês:**

Multiplex polymerase chain reaction

Cervical intraepithelial neoplasia

Uterine cervical neoplasms

**Área de concentração:** Oncologia Ginecológica e Mamária

**Titulação:** Mestra em Ciências da Saúde

**Banca examinadora:**

Júlio César Teixeira [Orientador]

Cecília Maria Roteli Martins

Luiz Carlos Zeferino

**Data de defesa:** 24-03-2015

**Programa de Pós-Graduação:** Tocoginecologia

**Diagramação e Revisão:** Assessoria Técnica do CAISM (ASTEC)

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA**  
**ELIANA FERREIRA PAES**

**ORIENTADOR: PROF. DR. JÚLIO CÉSAR TEIXEIRA**

---

---

---

**MEMBROS:**

1.

2.

3.

**Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade  
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

**Data: 24 / 03 / 2015**



# RESUMO

**Introdução:** O agente etiológico do câncer do colo do útero é um HPV de alto risco (hrHPV) e testes biomoleculares para detecção deste vírus em amostras do colo do útero tendem a ter um papel cada vez mais importante no rastreamento de lesões pré-câncer para o futuro. No momento, estes testes são de alto custo e de execução complexa. **Objetivo:** desenvolver e padronizar um teste de PCR multiplex marcado com fluorescência para detecção de DNA de hrHPV e genotipagem de 6 hrHPV em amostras obtidas do colo do útero e comparar com um teste de referência. **Metodologia:** foi realizado um estudo-piloto para descrição e padronização de um método de detecção e genotipagem de HPV, tipo PCR multiplex, com *primers* desenhados com base na região E7 de seis hrHPV (16, 18, 31, 33, 45 e 52), o teste 'E7-HPV'. A detecção viral foi realizada por meio de eletroforese capilar e sequenciador automático. Foi seguido um guia internacional para desenvolvimento de novos testes de HPV para rastreamento, que orienta uma avaliação inicial de 50 ou mais amostras de mulheres com NIC2+, comparação com um teste de referência validado, e alcançar um índice de concordância Kappa de 0,7, com sensibilidade de 90% da sensibilidade do teste de referência. O teste de referência adotado foi o *cobas<sup>®</sup> HPV Test* da *Roche Diagnostics*, chamado '*cobas<sup>®</sup>*', que identifica em grupo 12 hrHPV e genotipa os tipos 16 e 18, separadamente. Neste estudo foram utilizadas amostras de 60 pacientes, 55 com citologia ASCH/HSIL, coletadas entre agosto e setembro de

2013, que foram avaliadas por cada teste com cálculo da concordância dos resultados pelo índice de Kappa e comparação da sensibilidade, com poder estatístico de 90%. **Resultados:** o teste teve sua descrição e padronização finalizadas. Houve alta concordância entre os testes 'E7-HPV' e *cobas*<sup>®</sup> na detecção do HPV 16 com Kappa 0,972, com apenas um caso discordante, de paciente com NIC3 com *cobas*<sup>®</sup> negativo e com o teste 'E7-HPV' positivo. Para o HPV18, os resultados dos testes demonstraram concordância total, com índice Kappa=1,0. Quando comparadas as detecções dos tipos hrHPV não 16 e 18, seis casos foram positivos para o *cobas*<sup>®</sup> e negativos para o teste 'E7-HPV', podendo ser decorrentes da detecção do *cobas*<sup>®</sup> de tipos de HPV não contemplados no teste 'E7-HPV'. Ao contrário, o teste 'E7-HPV' detectou dois hrHPV adicionais, com *cobas*<sup>®</sup> negativo (HPV31 e 52). A sensibilidade de detecção de NIC2+ foi igual para os dois testes avaliados. **Conclusão:** Foi possível desenvolver e padronizar uma técnica de PCR multiplex com método para detecção de seis hrHPVs. O desempenho do teste 'E7-HPV' foi, pelo menos, equivalente ao teste de referência (*cobas*<sup>®</sup> HPV Test) com Kappa=0,972 e 100% da sensibilidade do teste de referência na detecção de NIC2+ em pacientes sabidamente com lesões, superando os pré-requisitos necessários. Assim, os resultados satisfatórios do 'E7-HPV' na primeira fase de avaliação possibilitam a continuidade do desenvolvimento do mesmo, visando à uma futura aplicação em maior escala.

Palavras-Chave: PCR Multiplex, Neoplasia intraepitelial cervical, neoplasia do colo do útero.



# ABSTRACT

**Introduction:** The etiologic agent of cervical cancer is a high-risk HPV (hrHPV) and biomolecular tests for detection of this virus in cervical samples tend to have an increasingly important role in screening for precancerous lesions for the future. At present, these tests are expensive and complex procedure. **Purpose:** to develop and standardize a multiplex PCR test, labeled with fluorochrome 6-FAM, to detect and genotyping of 6 hr-HPV DNA, tested in samples obtained from the cervix and compared with a reference test. **Methods:** A pilot study was performed to develop and standardize a methodology of the multiplex PCR with primers designed on the basis of six hrHPV E7 region (16, 18, 31, 33, 45 and 52), the E7-HPV test.. Viral detection was performed by capillary electrophoresis in automated sequencer. It was followed an international guide to development of new HPV testing for screening, which guides an initial assessment of 50 or more samples from women with CIN2+, and the results compared to a validated reference test to achieve a Kappa index of 0.7, and 90% sensitivity of reference sensitivity test. The reference test adopted was the cobas<sup>®</sup> HPV Test from Roche Diagnostics, called 'cobas<sup>®</sup>', which identifies 12 hrHPV pooled and genotype HPV 16 and 18 separately. In this study, cervix samples were obtained from 60 women, 55 with ASCH/HSIL cytology, collected between August to September 2013. The samples were evaluated by each test, and a non-inferiority analysis was conducted in relation to the cobas<sup>®</sup> HPV Test with Kappa index and sensitivity, with a statistical

power of 90%. **Results:** The methodology of E7-HPV test was described and standardized. The 'E7-HPV' test and cobas<sup>®</sup> Test had a high concordance rate in HPV16 detection (Kappa=0.972), with only one discordant case (CIN3 with negative cobas<sup>®</sup> and 'E7-HPV' HPV16 positive) and total concordance in HPV18 detection (Kappa=1.0). When comparing the detection of hrHPV not 16/18, six cases were positive for cobas<sup>®</sup> and negative for 'E7-HPV', maybe due to the detection for cobas<sup>®</sup> of HPV types not included in the 'E7- HPV ' test. Others three cases were 'E7-HPV' positive (HPV16, 31 and 52) with negative cobas<sup>®</sup>. For diagnosis of CIN2 or worse, both tests had the same sensitivity. **Conclusion:** It was possible to develop and standardize a multiplex PCR methodology for detection and genotyping 6 hrHPV in cervical samples. The performance of 'E7-HPV' test was at least equivalent to the reference test for the detection of CIN2+, fulfilling the clinical validation criteria requirements. Thus, the satisfactory initial results of the 'E7-HPV' test evaluation indicate that the development can be continued, aiming future application on a larger scale.

**KEYWORDS:** Multiplex Polymerase Chain Reaction, Cervical Intraepithelial Neoplasia, Uterine Cervical Neoplasms.

# SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT .....	ix
SUMÁRIO.....	xi
DEDICATÓRIA.....	xiii
AGRADECIMENTOS .....	xv
Fomento recebido .....	xvii
SIGLAS E ABREVIATURAS .....	xix
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. OBJETIVOS.....	17
2.1    Objetivo Geral.....	17
2.2    Objetivos Específicos .....	17
3. METODOLOGIA .....	19
3.1.    Delineamento do estudo e tamanho amostral .....	19
3.2.    Seleção de sujeitos .....	20
3.2.1    Critérios de Inclusão .....	21
3.2.2    Critérios de Exclusão.....	21
3.3.    Variáveis.....	21
3.4.    Procedimentos do Estudo.....	23
3.4.1    Controle de qualidade do teste 'E7-HPV' .....	23
3.4.2    Teste 'E7-HPV': Desenvolvimento, descrição e padronização do teste ..	25
3.4.3    Teste de referência: <i>cobas</i> <sup>®</sup> HPV Test .....	33
3.5.    Coleta, processamento dos dados e análise estatística.....	33
3.6.    Aspectos éticos .....	34
4. RESULTADOS.....	37
5. DISCUSSÃO.....	45
6. CONCLUSÕES.....	51
7. REFERÊNCIAS .....	53
8. ANEXOS .....	63

8.1.	ANEXO 1 - Quadro A1 - Testes de HPV validados e disponíveis .....	63
8.2.	ANEXO 2 - Roteiro original para desenvolvimento de teste de HPV, segundo Meijer CJ <i>et al</i> (51).....	64
8.3.	ANEXO 3 - Listagem para designação de numeração dos tubos para a coleta das amostras. ....	66
8.4.	ANEXO 4. Banco de dados obtidos.....	68
8.5.	ANEXO 5 - Avaliação do meio de conservação. ....	72
8.6.	ANEXO 6 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	73
8.7.	ANEXO 7 - Ficha pré-codificada: Desenvolvimento de um teste biomolecular para detecção de HPV em amostras cervicouterinas : descrição do método e avaliação inicial.....	77
8.8.	ANEXO 8 - Aprovação no CEP .....	78
8.9.	ANEXO 9 - Artigo submetido .....	82

# DEDICATÓRIA

*...ao alicerce da minha vida:*

*Deus*



# AGRADECIMENTOS

*Agradecer é olhar para trás e ter a convicção de que sozinho não se constrói nada, é sentir Deus nos iluminando em todos os momentos.*

*Agradeço a Deus pelo dom da vida, e por renovar nossas forças a cada amanhecer, despertando em nós o desejo e a oportunidade de contribuirmos para um mundo melhor.*

*Agradeço a Ele por colocar pessoas que são verdadeiros anjos terrestres que, de alguma forma, contribuíram com este trabalho, cada um com seu dom, mas com igual valor.*

*Ao Professor Doutor Júlio Cesar Teixeira, meu muito obrigada. Agradeço pela dedicação, paciência e orientação neste projeto.*

*À Dra. Ângela pela disponibilidade de nos agraciar com seu conhecimento e pelo incentivo de me aventurar neste universo que é a pesquisa.*

*Ao Professor Doutor Francisco Aoki, obrigada pela bondade de conceder o uso do laboratório para que pudéssemos desenvolver a pesquisa.*

*À UNICAMP, corpo docente e colaboradores, pela oportunidade e o privilégio que tive em fazer este Mestrado.*

*A todas as pacientes que, embora no anonimato, tiveram uma contribuição fundamental para que este trabalho fosse realizado. A vocês, a minha gratidão e solidariedade.*

*Aos meus pais Saturnino e Rosa pelo amor incondicional, que me faz sentir aquecida por este amor, mesmo quando estou distante.*

*Às minhas irmãs, Elaine (in memoriam), Valéria e Cláudia, por acreditarem em mim, mesmo quando eu não acreditava...*

*Aos meus amados sobrinhos, Francisco (in memoriam), Maria Fernanda e Manuela, verdadeiros presentinhos de Deus.*

*Agrício, Cristina, Leonardo e Ticiane, o meu obrigada sempre, sem vocês tudo seria muito mais difícil.*

*Adriana, Juliano, Murilo e Tio Mario, amigos que estiveram presentes nos momentos que precisei, obrigada.*

*A todos da ASTEC, obrigada pela contribuição na formatação deste trabalho e pelo carinho para comigo.*

*A todos do laboratório de Pesquisa em AIDS do Hospital das Clínicas e laboratório de Marcadores Biológicos e Biologia Molecular do CAISM, obrigada pelo apoio, momentos de descontração e principalmente pela amizade.*

*E a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada!.*



# **Fomento recebido**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)  
Bolsa Mestrado.



# SIGLAS E ABREVIATURAS

- ASC-US** – Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado
- CAISM** – Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
- CH2** – Captura Híbrida 2
- CO** – Colpcocitologia Oncológica
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)
- dNTPs** – desoxirribonucleotídeo trifosfato (A= Adenina, T= Timina, C= Citosina, G= Guanina)
- E** – Proteína precoce do HPV (E1 a E7)
- FDA** – *US Food and Drug Administration* - Órgão controlador dos Estados Unidos
- HIV** – Vírus da Imunodeficiência Humana
- HPV** – Papilomavírus Humano (*Human papillomavirus*)
- hrHPV** – Papilomavírus Humano de Alto risco oncogênico (*high risk HPV*)
- HSIL** – Alterações citológicas compatíveis com neoplasia
- ICTV** – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*)
- L** – Proteína tardia do HPV (L1 e L2)
- LEEP** – excisão eletrocirúrgica por alça (*Electrosurgical Excision Procedure*)
- lrHPV** – Papilomavírus Humano de Baixo risco oncogênico (*low-risk HPV*)

**MgCl<sub>2</sub>** – Cloreto de magnésio

**m-PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase do tipo multiplex

**m-RNA** – RNA mensageiro

**NIC** – Neoplasia Intraepitelial

**NIC1+** – Neoplasia de grau 1 ou pior

**NIC2+** – Neoplasia Intraepitelial de grau 2 ou pior

**NIC3** – Neoplasia Intraepitelial de grau 3

**NIC3+** – Neoplasia Intraepitelial de grau 3 ou pior

**ORF** – Quadros de leituras Abertos (*Open Reading Frames*)

**PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

**pRb** – Gene que codifica a proteína do retinoblastoma

**Primers** – Pequenos moldes de DNA (oligonucleotídeos)

**SUS** – Sistema Único de Saúde

**T<sub>a</sub>** – temperatura de *annealing*

**T<sub>m</sub>** – temperatura de *melting*

**UNICAMP** Universidade Estadual de Campinas

# 1. INTRODUÇÃO GERAL

Existe um amplo conhecimento sobre etiologia, gênese, medidas preventivas, diagnóstico precoce e tratamento adequado, desde as lesões pré-câncer até o câncer do colo do útero. Mesmo assim, 500.000 casos novos deste câncer são diagnosticados anualmente no mundo, correspondendo ao terceiro tipo de câncer mais frequente em mulheres e causando cerca de 270.000 mortes anuais (1, 2). Embora em muitos países observa-se um claro sucesso na utilização deste conhecimento com redução importante da mortalidade relacionada, regiões em desenvolvimento detêm mais de 80% destas mortes (3). No Brasil, a incidência estimada de câncer do colo do útero para 2014 é de 15.590 casos novos, com 20 mortes por dia (4).

A triagem populacional para detecção de lesões precursoras do câncer do colo do útero é baseada no rastreamento citológico, com o potencial de reduzir 80% da mortalidade (5). O método de Papanicolaou, descrito na década de 1940, começou a ser implantado no início dos anos 60, mas até o momento poucos países têm conseguido reduzir substancialmente suas taxas de prevalência e incidência deste câncer (6). No Brasil, dentre as inúmeras dificuldades encontradas para o rastreamento, destacam-se a baixa cobertura populacional, a falta de repetição periódica e o adequado procedimento frente a um resultado alterado. Em uma visão geral, no Brasil há predomínio do rastreamento oportunístico, com avaliações em excesso de um pequeno grupo de mulheres que

procuram serviços de saúde por outras razões, gerando uma baixa cobertura populacional (7).

O agente etiológico do câncer do colo do útero é o papilomavírus humano (HPV), estando presente em 99,7% dos casos, sendo considerado um fator necessário para o desenvolvimento desta neoplasia, porém não suficiente, já que outros fatores como baixa idade ao início sexual, maior número de parceiros sexuais, tabagismo, alta paridade, uso prolongado de contraceptivos hormonais e coinfeção com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) estão frequentemente associados com a persistência e progressão da infecção (8-11). A infecção pelo HPV é a mais comum das doenças sexualmente transmissíveis e estima-se que 291 milhões de mulheres no mundo estejam infectadas (12).

O HPV tem como alvo um epitélio cutâneo ou de mucosa, e dentre os mais de 40 tipos identificados na mucosa genital, 15 deles estão reconhecidamente envolvidos no câncer do colo do útero e lesões intraepiteliais pré-cancerosas. Os diferentes tipos virais são classificados de acordo com o potencial de produzir lesões e câncer, sendo exemplos de HPV de alto risco oncogênico (*high-risk*, “hrHPV”), os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 e 58 e de baixo risco (*low-risk*, “lrHPV”), por exemplo, os tipos 6, 11, 42, 43 e 44, que produzem lesões intraepiteliais do colo do útero de baixo grau e verrugas genitais (12-15).

Para o câncer de colo do útero, em uma avaliação mais recente com amostras de cerca de nove mil casos de neoplasias provenientes de todo o mundo, de Sanjosé e colaboradores, em 2010, confirmaram avaliações e metanálises prévias, onde o HPV16 é o mais frequentemente observado com

61%; o HPV18 foi o segundo tipo mais prevalente e presente em 10%, seguido pelo HPV45 em 6% e, depois, os tipos 31 e 33 com 4% cada (16).

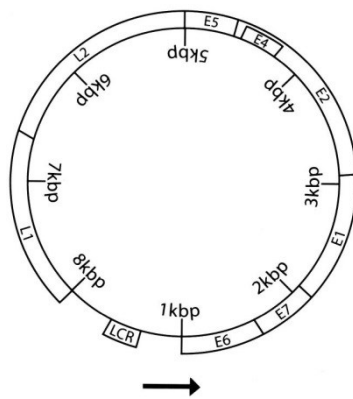
No Brasil, em 2004, estudo realizado com 1.318 mulheres sexualmente ativas de diferentes regiões do país observou o HPV16 como o mais frequente, seguido dos tipos 52, 31, 51, 68 e 18 (17). Outro estudo recente realizado no Brasil concluiu que de 328 mulheres com neoplasia intraepitelial cervical (NIC) ou câncer, 87% estavam infectadas pelo HPV e em 52% as infecções eram múltiplas. O HPV mais prevalente neste estudo foi o HPV16, presente em 49% dos casos positivos, seguidos pelos HPVs 58, 52, 31, 35, 33 e 18 (18).

Embora haja uma pequena variação na prevalência dos tipos de HPV detectados nos diversos países, a proporção dos diferentes tipos virais presentes no câncer do colo do útero é mantida para os cinco primeiros tipos: 16, 18, 45, 31 e 33 (12, 13).

As infecções por HPV na grande maioria das vezes são assintomáticas e transitórias, sendo eliminadas em até dois anos, porém, em alguns casos a infecção persistente está associada a um risco elevado de detecção de uma lesão de alto grau no seguimento. Isto foi demonstrado através de detecção de DNA de hrHPV em amostras seriadas provenientes da região do colo do útero, como o estudo de Kjaer e colaboradores realizado na Dinamarca. Nesse estudo, os autores encontraram que a persistência da detecção do DNA do HPV16 por dois anos esteve associada com uma proporção de risco 813 vezes maior para diagnóstico de NIC2+ (NIC grau 2 ou pior), quando comparado àquelas mulheres que permaneceram sem HPV detectável pelo mesmo período (19).

Os HPVs são pequenos vírus de DNA, pertencentes à família Papillomaviridae, têm diâmetro em torno de 55nm, não envelopados, de simetria icosaédrica, composto por 72 capsômeros (20). Seu genoma de dupla fita circular com tamanho aproximado de 8000 pares de bases associados a histonas, possui oito fases abertas de leitura (*open reading frames* - ORF), funcionalmente divididas em região que codifica proteínas de expressão precoce (E, *early*), E1, E2, E4, E5, E6 e E7 e região que codifica proteínas de expressão tardia (L, *late*), L1 e L2 (21). As duas regiões são separadas por uma região reguladora (*long control region*, LCR, ou *upstream regulatory region*, URR). As proteínas expressadas pelos genes E1 e E2 estão envolvidas na expressão e replicação viral, sendo essenciais para a fase de amplificação, e os genes E4 e E5, provavelmente e da mesma forma, estão envolvidos na amplificação do genoma. As proteínas do gene E5, além de participar na formação de coilócitos, também possuem a capacidade de formação de poros, contribuindo para a apoptose celular. As proteínas E6 e E7 estão diretamente relacionadas com a transformação celular, cujas atividades resultam em acúmulo de erros genéticos na célula infectada. Por fim, os genes L1 e L2 codificam as proteínas que formam o capsídeo viral (Figura 1) (20-22).

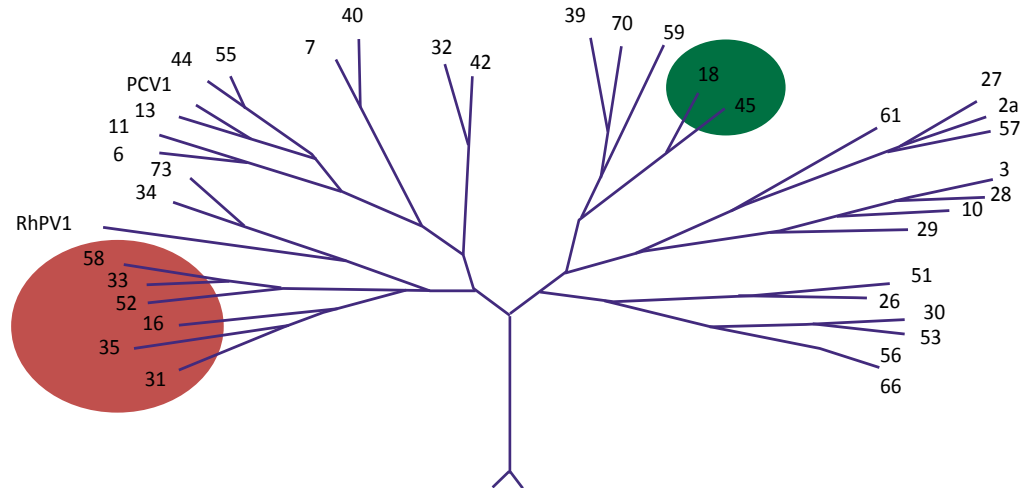




**Figura 1:** Representação do Genoma circular do HPV - (Burd EM, 2003).

A taxonomia e nomenclatura viral do HPV foram elaboradas pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), sendo a classificação filogenética do HPV baseada nas sequências nucleotídicas do gene L1, região mais conservada do genoma viral. Para identificação de um novo tipo é necessário que a região L1 seja divergente em mais de 10%, ao passo que é definido um subtipo quando a diferença encontra-se entre 2% e 10% e uma variante, com diferença menor que 2% em relação ao gene L1 do tipo viral de referência (21, 22). Até o momento, foram descritos 120 tipos de HPV e são classificados em cinco gêneros, alfa, beta, gama, mu e nu-papilomavírus (Figura 2) (21, 22).

## Papillomavirus: árvore filogenética



- Mostrado os alpha-papillomavirus
- **HPV 16** é mais relacionado ao **HPV 31**
- **HPV 18** é mais relacionado ao **HPV 45**

Adaptado de Villiers EM *et al. Virology*. 2004;324:17-27

O ciclo de vida do HPV é dependente da diferenciação celular do epitélio infectado do hospedeiro e se inicia quando partículas infecciosas do vírus penetram nas células basais através de microlesões ocasionadas principalmente durante o intercuro sexual (23-25). Após a entrada do vírus na célula e seu desencapsulamento, o genoma viral é transportado para o núcleo da célula e se estabiliza na forma episomal, inicialmente produzindo poucas cópias virais, mantidas em baixo número nas células basais (24). Ao iniciar o processo de divisão celular, as células infectadas fornecem igualmente o DNA viral entre suas descendentes. Parte delas migra da camada basal para a superfície do epitélio por

meio do processo de diferenciação celular e assim completam seu ciclo. As demais continuam na camada basal por várias décadas servindo de reservatório de DNA viral para futuras divisões celulares ou são eliminadas pelo sistema imune (26). A produção de cópias do HPV ocorre progressivamente nas camadas de células suprabasais (27, 28).

Nos casos de câncer, o genoma do vírus encontra-se integrado ao da célula hospedeira e esta integração ocorre quando o DNA viral passa da forma episomal para linear. O processo de integração ao DNA celular começa com uma quebra no genoma viral, que ocorre geralmente nas regiões dos genes E1 e E2 do vírus. O resultado desta separação é uma perda de função desses dois genes e uma desregulação dos genes E6 e E7, que começam a ser transcritos. Com as proteínas resultantes de E6 e E7, as quais se ligam, respectivamente, com a proteína p53 e à proteína do retinoblastoma (pRb), as guardiãs do genoma, como são chamadas, são “inativadas”. Esta ação é considerada uma das principais peças na carcinogênese (26, 29).

Mais detalhadamente, a proteína E6 se liga a um membro da E3 de ubiquitina ligase E6AP, induzindo a formação de um complexo com a p53, o que gera a degradação desta última proteína via ubiquitina. A proteína E7 se liga à pRb e a degrada através da via proteossomo. O resultado é a perda de controle do ciclo celular, fazendo com que a célula seja incapaz de corrigir os erros intrínsecos no seu DNA durante a replicação e acumule alterações genéticas. Além do exposto, existe a perda da capacidade de apoptose, ou seja, a célula se torna - com mutações - imortal, característica de uma célula neoplásica (25, 29).

Atualmente o teste considerado padrão-ouro para detecção do DNA do HPV é a reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR é uma reação enzimática usada na biologia molecular que se baseia na amplificação exponencial de um fragmento gênico de interesse, empregando elementos do processo natural de replicação de DNA (30).

A técnica da PCR foi descrita na década de 1980 por Kary B. Mullis e teve sua primeira publicação na *Science* em 1985, descrevendo a técnica na amplificação do gene da  $\beta$ -globina humana (31, 32). Em 1988, Saiki e colaboradores apresentaram o uso do DNA polimerase termoestável (Taq DNA polimerase), que mostrou estabilidade em temperaturas superiores a 94°C, otimizando o processo da PCR (33).

A PCR utiliza os seguintes reagentes básicos: DNA, *Primers*, Taq DNA polimerase, cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ), solução tampão, dNTPs (trifosfato desoxirribonucleotídeo).

Pequenas quantidades de DNA são suficientes para uma PCR gerar milhares de cópias para serem analisadas posteriormente. Os *primers* são oligonucleotídeos sintéticos com uma sequência curta definida que flanqueiam a região-alvo que se deseja amplificar, onde os dNTPs serão adicionados pela ação da enzima Taq DNA polimerase. O  $MgCl_2$  é o doador de íons  $Mg^{++}$ , que são cofatores indispensáveis para a atividade desta enzima. A solução tampão é usada para manter o pH e as condições iônicas ideais para que a reação da PCR ocorra. Os desoxirribonucleotídeos são as quatro bases, adenina, timina, citosina e guanina, encontradas no DNA e utilizadas pela Taq DNA polimerase para amplificação de uma nova fita. Devido às múltiplas temperaturas e ciclos

repetitivos, a reação de PCR ocorre em um equipamento denominado termociclador, o qual permite ao usuário alterar alguns parâmetros como tempo, temperatura e número de ciclos (20 a 35 ciclos). Cada ciclo é composto por três etapas: desnaturação, anelamento e extensão (34, 35).

Na fase de desnaturação, a dupla fita de DNA é separada por aquecimento a uma temperatura elevada de aproximadamente 94°C. A fase de anelamento ou hibridização ocorre na temperatura em torno de 55°C. Nesta fase, os *primers* se anelam ao DNA através da complementariedade de bases, indicando os pontos inicial e final da nova cópia de DNA.

Durante a fase de extensão, a enzima Taq DNA polimerase, em presença de dNTPs e outros fatores envolvidos na reação, replicam a sequência-alvo do DNA a uma temperatura de 72°C. A Taq DNA polimerase sintetiza sempre na direção 5' - 3'. No fim de um ciclo obtêm-se duas novas fitas de DNA para cada alvo da dupla fita e, ao término dos 35 ciclos, existirão milhões de cópias da sequência-alvo de interesse, denominadas amplicons (35).

Atualmente, há vários tipos de PCR e entre suas variantes destaca-se, para o contexto deste estudo, a PCR Multiplex (m-PCR). A m-PCR faz uso de dois ou mais conjuntos de *primers* na mesma reação, ou seja, dois ou mais *loci* são amplificados simultaneamente. Desde sua primeira descrição em 1988, por Chamberlain e colaboradores, esse método tem sido usado com várias finalidades como no diagnóstico de doenças, na genética forense e no estudo de polimorfismo microsatélites (36, 37). Entre as vantagens da m-PCR destacam-se a diminuição dos reagentes utilizados nas reações, menor tempo na realização do teste, além de diminuir consideravelmente o trabalho envolvido em todas essas etapas.

Por outro lado, alguns cuidados devem ser observados para garantir uma reação adequada em virtude da utilização de mais de um par de *primers* ao mesmo tempo: um cuidadoso desenho dos *primers*, determinação da concentração dos mesmos, temperatura de anelamento e número de ciclos da PCR (38, 39).

A visualização dos produtos da PCR pode ser realizada por eletroforese em gel de agarose, utilizando brometo de etídeo ou fluorocromo (34). A análise em gel de agarose apresenta facilidade de execução, porém possui baixa sensibilidade. Alternativamente, a identificação de fragmentos resultantes da amplificação da PCR pode ser realizada em equipamentos de eletroforese capilar utilizados para sequenciamento de DNA. Esse procedimento apresenta alta precisão, porém possui maior custo, que é relacionado ao equipamento (40,41).

Buscando simplificar e baratear o processo, com ampliação do acesso, novos testes para detecção de HPV estão surgindo, sempre associados à padronização cada vez mais abrangente, com automação progressiva e desenvolvimento de *kits* específicos, melhorando a qualidade e reprodutibilidade dos mesmos. Atualmente, alguns testes estão disponíveis para utilização como auxiliar do método tradicional de rastreamento populacional - a citologia -, objetivando uma diminuição dos falsos-negativo e identificação de mulheres com maior risco para o desenvolvimento das lesões pré-câncer, e, ainda, auxiliando na indicação terapêutica e no seguimento pós-tratamento (42).

O primeiro teste estudado largamente e licenciado pelo órgão controlador dos Estados Unidos (*US Food and Drug Administration-FDA*) para utilização no rastreamento de mulheres, primário ou associado à citologia, foi a Captura Híbrida

2<sup>®</sup> (CH2), aprovado em 2003. O principal estudo realizado para avaliação da CH2 foi o ALTS, e seus principais achados sustentaram a indicação da utilização do teste em triagem para colposcopia em mulheres com 30 anos ou mais, com citologia ASC-US e um teste positivo. Ao contrário, demonstraram a ausência de benefício do teste quando há citologia alterada e sugestiva de lesão de baixo grau ou pior, pois o teste foi positivo na maioria dos casos. Assim, atualmente a CH2 está indicada em associação com a citologia em meio líquido e realizada nos casos de citologia ASC-US em mulheres com 30 anos ou mais. É considerado o teste de referência para comparação com novos testes que almejam uma aplicabilidade mais ampla (43, 44).

Em 2011, outro teste foi aprovado para uso em diagnóstico pelo FDA, o *cobas<sup>®</sup> HPV Test* da *Roche Diagnostics*, que aplicou a evolução tecnológica ocorrida na pesquisa e identificação de DNA por PCR, em tempo real, e na genotipagem, aliado ao crescente conhecimento da epidemiologia e história natural da infecção por HPV. Ainda, o teste adiciona facilidades como processamento rápido e automatizado das amostras e foi avaliado no estudo ATHENA com mais de 47 mil mulheres, já finalizado, cujos resultados mostraram uma diminuição do falso-negativo da citologia de 83 casos de NIC3+ para 19 casos, sem aumento significativo no número de colposcopias ou tratamentos desnecessários. O *cobas<sup>®</sup> HPV Test* licenciado identifica 14 hrHPV e, quando positivo, no mesmo momento, genotipa os HPV16 e HPV18. Em 2014, o teste passou também a ser licenciado para utilização como rastreamento primário nos EUA (45-48).

Além destes, existem outros testes biomoleculares validados e disponíveis (ANEXO 1), que detectam grupos de hrHPV ou procuram identificar aqueles de maior poder oncogênico, como os HPVs 16, 18, 31 e 45, ou ainda, detectar a presença de HPV que esteja em possível atividade oncogênica, através de identificação de m-RNA correspondente a oncoproteínas expressas por HPV, tipo E6 e ou E7 (49,50).

Para o desenvolvimento de futuros novos testes candidatos à ferramenta para participar de rastreamento populacional, *experts* no assunto definiram um roteiro mínimo para validação de um teste candidato (51) (ANEXO 2). O objetivo deste roteiro é organizar este desenvolvimento e economizar no processo, aproveitando conhecimentos adquiridos de grandes e custosos estudos clínicos já realizados e, por fim, manter a credibilidade dos testes de HPV. Resumidamente, o roteiro parte aproveitando toda informação proveniente do estudo da CH2 e sua liberação pelo FDA e, assim, qualquer novo teste tem que demonstrar desempenho equiparado ou superior, em uma comparação direta com a CH2 na detecção de NIC2+ (51).

A avaliação de um teste candidato segue três fases:

1º. Alcançar 90% da sensibilidade da CH2 na detecção de NIC2+ em estudo de não inferioridade, testado em amostras provenientes de mulheres com lesões diagnosticadas (NIC2+). Assumindo que a sensibilidade entre os testes seja igual e que haja uma boa concordância nos resultados ( $Kappa=0,7$ ), esta avaliação tem um poder estatístico de 80% quando o



número de amostras é de 50 ou mais, 90% para 60 amostras e 99% para 100 amostras.

**2º.** Alcançar especificidade de 98% na detecção de NIC2+ em mulheres com 30 anos ou mais em rastreamento de rotina (sem NIC2+). Assumindo que a especificidade entre os testes seja igual e que haja uma boa concordância nos resultados ( $Kappa=0,7$ ), os dois testes devem ser realizados em pelo menos 800 mulheres para um poder estatístico de 80%, ou 2.500 mulheres para 99% de poder estatístico.

**3º.** Demonstrar reprodutibilidade intra e interlaboratório, com concordância com intervalo de confiança de 87% ou mais, na avaliação de 500 amostras, sendo um terço, positiva pela CH2.

No Brasil, alguns destes testes biomoleculares para detecção de HPV estão disponíveis na clínica privada, mas não em todos os locais e a custo elevado. No SUS não há teste de HPV disponibilizado para o rastreamento populacional de câncer do colo do útero, além da citologia convencional.

Paralelamente e também resultante da evolução do conhecimento relacionado ao HPV e do desenvolvimento tecnológico, duas vacinas contra HPV oncogênicos, profiláticas, foram desenvolvidas a partir da década de 1990 e licenciadas para utilização desde 2007. Embora apresentem algumas diferenças entre si, as duas têm um foco comum na prevenção da infecção pelos HPVs 16 e 18, com o potencial de diminuir cerca de 70% do total de câncer de colo do útero.

Durante os estudos clínicos com as duas vacinas foram demonstradas elevada eficácia na prevenção de lesões precursoras de alto grau, e adequadas imunogenicidade e segurança em mulheres de 15 a 26 anos de idade e até nove anos de seguimento (52). Estudo de ponte imunogênica em meninas de 10 a 14 anos mostrou segurança e imunogenicidade maiores que aquelas da população dos estudos de referência para eficácia (53-55).

Com base nesses resultados, a Austrália foi o primeiro país a introduzir esta vacina em 2007 em um programa de imunização nacional, em mulheres com até 26 anos, e o primeiro a relatar uma queda significativa de lesões pré-câncer de alto grau em 2011 (56, 57). No Brasil, a inclusão da vacina no programa nacional de vacinação teve início em 2014, sendo o público-alvo meninas entre 11 e 13 anos (58).

O panorama previsto para o futuro é de uma população vacinada com a perspectiva de haver menor prevalência de detecção de HPV, principalmente para aqueles presentes nas vacinas. O conhecimento sobre a situação futura dos diferentes tipos de HPV em população vacinada deve demorar, e será possível se houver vigilância epidemiológica pós-vacinal. Este conhecimento estará na dependência de um acompanhamento adequado, ou seja, mais provável de ocorrer nos mesmos países em que o rastreamento citológico organizado teve impacto significativo na diminuição de mortalidade por câncer de colo do útero. Nos estudos com ambas as vacinas foram demonstradas diminuição de citologias alteradas em torno de 30% para as alterações de baixo grau e de cerca de 50% a 70% para as de alto grau.

Assim, em uma população vacinada espera-se que a diminuição de citologias alteradas leve à queda na acurácia da citologia como método de rastreamento e, ao contrário, ocorrendo menor prevalência de HPV determinada pela vacinação populacional, que haja uma melhora na acurácia dos testes biomoleculares (59).

Futuramente, pode ser esperado que testes biomoleculares para a detecção de DNA de hrHPV tenderão a ter um papel crucial no rastreamento e alguns destes testes já estão sendo avaliados em estudos de base populacional, podendo ser uma ferramenta viável para triagem primária em população vacinada contra HPV (57, 60).

Frente ao possível cenário futuro descrito, um teste biomolecular de fácil execução, reprodutível, confiável, que detecte os principais hrHPVs e apresente características que possibilite ser realizado em larga escala, em tempo curto e a custo reduzido, tem grandes chances de ser uma importante ferramenta em programas de rastreamento populacional, ou mesmo no período de transição do rastreamento com pacientes vacinadas e não vacinadas.

Visando a desenvolver uma alternativa local que propicie uma possível adequação à situação futura, foi realizado um estudo no Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), para avaliação inicial de um teste biomolecular cujo objetivo é estudar o limiar de detecção da técnica de PCR multiplex fluorescente aliada à eletroforese capilar na detecção e identificação dos principais tipos de hrHPV relacionados ao câncer do colo do útero: os HPVs 16, 18, 31, 33, 45 e 52.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Desenvolver e padronizar um teste biomolecular para detecção de DNA de seis hrHPVs com genotipagem e comparar com um teste de referência aplicado em amostras obtidas do colo do útero.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Desenvolver e descrever um método de execução para o teste em estudo na detecção de DNA de hrHPV, definindo um método-padrão.
- Comparar o desempenho do teste em estudo com o teste de referência na detecção de HPVs 16 e 18, em amostras obtidas do colo do útero de pacientes com e sem lesões no colo.
- Comparar o desempenho do teste em estudo com o teste de referência na detecção de hrHPVs não 16 ou 18, em amostras obtidas do colo do útero de pacientes com e sem lesões no colo.
- Comparar a sensibilidade entre o teste em estudo e o teste de referência na detecção de NIC2+.
- Validação inicial do teste em estudo segundo critérios de roteiro internacional para desenvolvimento de novos testes de HPV para rastreamento.



## 3. METODOLOGIA

### 3.1. Delineamento do estudo e tamanho amostral

O desenho do estudo e o tamanho amostral foram calculados seguindo a referência de um guia de orientação internacional para desenvolvimento de testes de HPV para fins de rastreamento. O objetivo deste guia desenvolvido por *experts* no assunto é de normatizar um padrão mínimo aceitável para os procedimentos utilizados no desenvolvimento e análise de novos testes. Ao final, espera-se ser possível alcançar resultados confiáveis e testes padronizados de possível utilização prática, sem a necessidade de repetição de estudos já realizados com o teste considerado padrão-ouro, o teste Captura Híbrida 2<sup>®</sup> (CH2), licenciado pelo FDA Norte-Americano em 2003. A premissa básica é de que o teste candidato apresente ao final, um desempenho igual ou superior ao demonstrado pela CH2. O seguimento pormenorizado deste processo será importante se houver possibilidade de certificação externa para utilização do teste em estudo, no futuro.

Nesta pesquisa foi adotada uma modificação no roteiro original com a utilização do *cobas<sup>®</sup> HPV test* da *Roche Diagnostics* como referência, ao invés da CH2. Este teste da Roche foi aprovado pelo FDA em 2011, após sua comparação com a CH2, com demonstração de uma acurácia melhor. Enquanto os dois testes identificam hrHPVs agrupados, o *cobas<sup>®</sup> HPV test* também faz a genotipagem dos tipos de HPVs 16 e 18, ou seja, com maior detalhamento da informação fornecida pelo teste ([43](#), [46](#), [51](#), [61](#), [62](#)).

Este estudo compreende a primeira fase do roteiro seguido e teve um delineamento do tipo teste diagnóstico, visando a desenvolver e padronizar uma técnica de m-PCR marcado com fluorescência, com objetivo de identificar seis tipos de hrHPV em amostras coletadas do colo do útero de 60 mulheres, e comparadas com o teste de referência (*cobas<sup>®</sup> HPV Test*). Paralelamente, nas amostras das 20 primeiras mulheres foi validado um meio de conservação de amostras alternativo, o PBS (Tampão fosfato salino) na realização do *cobas<sup>®</sup> HPV Test*. Diferentemente dos meios de conservação comerciais mais utilizados, o PBS foi mantido a -20°C após a coleta da amostra. Esta validação permitirá que amostras mantidas congeladas de outras pesquisas sejam possíveis de serem analisadas pelo *cobas<sup>®</sup> HPV Test*, e com resultados confiáveis (ANEXO 3).

### **3.2. Seleção de sujeitos**

As 60 mulheres participantes do estudo foram selecionadas entre aquelas que compareceram para atendimento ginecológico regular nos ambulatórios do Hospital da Mulher-CAISM, UNICAMP, no período de agosto a setembro de 2013, e foram selecionadas da seguinte maneira:

- Cinquenta e cinco mulheres com citologia de alto grau ou diagnóstico de NIC2+, previamente à conização do colo e com lesão presente à colposcopia, ou seja, com alta possibilidade de apresentarem um teste de hrHPV positivo, atendidas no Ambulatório de Oncologia – PTGI Colo. Ao final, o diagnóstico histopatológico definitivo foi de NIC2+ para 49 pacientes e NIC1+ para 53 pacientes. Duas pacientes (casos 12 e 17 com CO ASC-H



e colposcopias positivas) não tiveram diagnóstico de NIC e estão em seguimento, consideradas para análise como negativas (ANEXO 4).

- Cinco mulheres - sendo quatro com mais de 30 anos - que compareceram para exame ginecológico de rotina em Ambulatórios de Oncologia, sem patologia cervical atual e por pelo menos dois anos, suspeitada ou confirmada, e com colo do útero preservado, ou seja, com maior probabilidade de terem um teste hrHPV negativo.

### **3.2.1 Critérios de Inclusão**

- Assinatura do termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pela participante;
- Idade acima de 18 anos;
- Útero com colo presente.

### **3.2.2 Critérios de Exclusão**

- Gravidez
- Uso de Medicamentos via vaginal nos dois dias precedentes ao da coleta da amostra cervical.

## **3.3. Variáveis**

- a) Teste em estudo: teste desenhado com objetivo de detectar seis tipos de hrHPV, tipos 16, 18, 31, 33, 45 e 52, individualmente, utilizando *primers* novos com alvo na região E7 viral e marcados com fluorocromo 6 FAM

(carboxi fluoresceína), através de eletroforese capilar e utilizando um sequenciador automático com *software* para genotipagem. O teste foi designado como 'E7-HPV' e categorizado em negativo ou positivo para cada HPV detectado.

- b) Teste de referência: foi adotado o *cobas*<sup>®</sup> HPV Test, chamado de '*cobas*<sup>®</sup>', é um teste qualitativo que utiliza a tecnologia PCR em tempo real para detectar 12 tipos de hrHPV em grupo (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68), e individualmente, os HPVs 16, 18 e a  $\beta$ -globina. O teste foi categorizado em negativo ou positivo para os 12 tipos de hrHPV agrupado ou para HPV16 e/ou 18 isoladamente. Em casos selecionados e discordantes, o '*cobas*<sup>®</sup>' foi repetido para confirmação.
- c) Teste para casos discordantes: utilizamos o teste *CLART*<sup>®</sup> HPV2 (*Genomica*), designado como "*CLART*<sup>®</sup>", que é um PCR DNA-Microarray, que detecta e genotipa 35 tipos de HPV diferentes (hrHPV, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82, 85 e lrHPV, 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 71, 72, 81, 83, 84 e 89). O teste foi categorizado em negativo ou positivo para cada HPV detectado (63).
- d) Lesão em colo de útero por HPV: a presença ou não de lesão por HPV no momento da coleta das amostras, definida pelo resultado histopatológico de biópsia de colo ou conização (LEEP- *Electrosurgical Excision Procedure*, ou

seja, excisão eletrocirúrgica por alça). Será considerado o diagnóstico histológico mais grave e categorizado em:

- ⇒ NIC1+: Neoplasia Intraepitelial de grau 1 ou pior;
- ⇒ NIC2+: Neoplasia Intraepitelial de grau 2 ou pior;
- ⇒ Negativo: sem detecção de anormalidades histopatológicas.

e) Idade: medida em anos completos na data da coleta da amostra do colo do útero.

### **3.4. Procedimentos do Estudo**

#### **3.4.1 Controle de qualidade do teste 'E7-HPV'**

**a) Meio de conservação das amostras** - Inicialmente, as amostras coletadas do colo do útero das 20 primeiras mulheres, sendo 15 do grupo com suspeita de NIC, ou seja, com alta possibilidade de um teste de hrHPV ser positivo, e cinco mulheres sem patologia suspeitada ou confirmada, ou seja, com maior probabilidade de terem um teste hrHPV negativo, foram colocadas em dois meios de conservação (MC) diferentes, um já padronizado para o *cobas*<sup>®</sup> (*SurePath*<sup>®</sup>) e outro meio (PBS), em avaliação, e que está sendo utilizado para conservação de amostras de outras pesquisas, inclusive congeladas.

A ordem de utilização de cada frasco com os dois MC para uma dada paciente foi pré-definida por um roteiro, com o cuidado para

que a primeira das duas amostras tenha sido depositada em 50% de cada um dos MC, conforme o Anexo 3. Ainda, para o MC em avaliação, 50% das amostras foram mantidas em geladeira e outras 50% congeladas a -30° C. Todas as amostras do MC licenciado foram mantidas em geladeira. O tempo entre a coleta e a execução do teste variou de sete a 30 dias e todos os 40 testes destas 20 pacientes foram realizados no Laboratório IPOG de São Paulo, que foi indicado pela Roche Diagnóstica do Brasil, por possuir sistema automatizado específico, licenciado e validado. O laboratório externo não teve conhecimento de informações clínicas individuais ou que possibilitassem identificar as pacientes ou o correto pareamento das amostras, evitando possível interferência nos resultados. O envio do material, acondicionamento e identificação numérica dos mesmos foram realizados pelo orientador, sendo, portanto, o único capaz de conhecer os resultados que indicaram a validade do MC em avaliação e dar prosseguimento ao projeto. O MC foi validado após verificação pelo orientador de 100% de concordância nos resultados do *cobas*<sup>®</sup> para os dois MC e também, se o MC em avaliação foi mantido congelado ou não (ANEXO 5). Validado o MC “PBS”, completou-se a coleta até o total de 60 amostras.

**b) PCR da  $\beta$ -globina** - Para controle da extração do DNA foi amplificado um fragmento de 268pb do gene da  $\beta$ -globina humana por PCR convencional e leitura em gel de agarose. A positividade da detecção do gene da  $\beta$ -globina representa, indiretamente, a

possibilidade de recuperação de material genético na amostra, selecionando, dessa forma, os espécimes adequados para serem submetidos à execução da pesquisa de DNA de HPV. A positividade do gene da  $\beta$ -globina ocorreu nas 60 amostras estudadas.

**c) Quantificação de DNA** - A concentração e pureza do DNA foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), por leitura da densidade óptica no comprimento de onda de 260-280nm, e todas as 60 amostras apresentaram a concentração esperada de 5-50ng e pureza de 1,80.

Em todos os ensaios foram incluídos controles negativos contendo todos os reagentes, exceto DNA, para monitoramento de possíveis contaminações, bem como controles positivos, com DNA obtido de amostras previamente conhecidas. As amostras foram testadas em duplicata por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio 1 $\mu$ g/ml para análise e por eletroforese capilar, e os resultados expressos foram 100% concordantes (ANEXO 4).

#### **3.4.2 Teste 'E7-HPV': Desenvolvimento, descrição e padronização do teste**

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Marcadores Biológicos e Biologia Molecular do CAISM, onde os ambientes destinados à execução de cada etapa do procedimento da PCR (extração de DNA, manipulação de reagentes da PCR, eletroforese) são fisicamente separados, minimizando o potencial de risco de contaminação.

O desenvolvimento do teste 'E7-HPV' consistiu de várias etapas, com testagem de procedimentos, descrição e padronização da técnica utilizada para o teste, visando à identificação de hrHPV com genotipagem de seis tipos, conforme as etapas descritas a seguir:

- **Método de Extração de Ácidos Nucleicos “*in house*”**

As amostras foram coletadas e armazenadas. Após centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos o sobrenadante foi removido, e ao *pellet* celular resultante foi adicionado 200µl da solução de digestão (1mM Tris pH 7,5 200µg/ml de proteinase K, 0,5% SDS) homogeneizadas e incubadas a 55°C por 2 horas e a 95°C por 5 minutos. Após, foi adicionado 200µl de solução de fenol, clorofórmio, álcool isoamílico (25:24: 1), o tubo foi agitado vigorosamente e centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos. A fase aquosa foi removida e transferida para outro tubo, ao qual foi acrescentado acetato de sódio (NaAc) 3M com pH 5,2 na proporção 1/10. Foi adicionado etanol absoluto no volume de 2,5 vezes do conteúdo do tubo. Após agitação, a solução foi centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi removido e ao *pellet* de DNA foi adicionado 600µl de etanol 70% e, em seguida, centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante removido, e após evaporação total do etanol, foi ressuspenso em 20µl da solução de TE (1mM Tris, 100µM EDTA, pH 8,2). Após 24 horas em geladeira, o DNA foi estocado a -20°C.

- **PCR Multiplex**

PCR Multiplex é uma variante da PCR que permite detectar simultaneamente múltiplos fragmentos de DNA de agentes infecciosos-alvo em uma única reação, usando mais de um par de *primers*. Uma das questões fundamentais relacionadas à execução de PCRs multiplex é o desenho dos *primers*, uma vez que problemas como número e especificidade dos *primers* são mais complicados de serem resolvidos (38, 39).

- **Construção de novos *primers* para o teste ‘E7-HPV’**

Durante este trabalho foram desenhados novos *primers*. O desenho de *primers* é uma das etapas mais importantes para que se alcance uma reação de PCR bem sucedida. Quando se desenha *primers* para aplicações em PCR multiplex ou convencional é essencial verificar o tamanho do amplicon para facilitar a visualização, selecionar as sequências sense e antissense, livres de possíveis dímeros ou formação de alças intermoleculares, para que a reação seja totalmente eficiente. Este processo requer a utilização de ferramentas de bioinformática e experiência na confecção de *primers*.

Existem várias ferramentas computacionais que auxiliam na tarefa de desenho de *primers*. Exemplos de ferramentas disponíveis na internet são o Web Primer, Gene Runner, Primer 3, Primer-BLAST, entre outros. As ferramentas Gene Runner e Primer 3 são programas eficientes de desenho de *primers* para PCR que permitem um controle considerável sobre a natureza dos *primers*, incluindo o tamanho do produto desejado, o tamanho do *primer* e o intervalo da temperatura de *melting* ( $T_m$ ).

Os *primers* foram desenhados com o auxílio do programa *GeneRunner* versão 3.00 (64), sendo a sua construção baseada no alinhamento da sequência-alvo na região E7 dos genes do papilomavírus humano disponível na base de dados GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (65). *Primers* trabalham em pares (sense e antissense) e foram construídos com tamanho variando de 18 e 25 nucleotídeos.

Na construção dos *primers* foi considerado fator relevante que os seus pares não tenham diferenças nas temperaturas de anelamento, especificidade no *annealing* e tamanho do fragmento amplificado. Houve também o cuidado de não haver complementaridade entre as três últimas bases finais da extremidade 3', para evitar a formação de estruturas secundárias chamadas hetero-dímero, que impediriam sua dimerização.

Se a temperatura de *annealing* ocorrer entre dois *primers* sense ou dois *primers* antissense, ocorre a formação de uma estrutura secundária denominada *self-dimer*.

*Primers* longos podem se autoparear, resultando em estruturas secundárias denominadas *hairpins*.

Um *primer* é específico se ele pareia com a fita molde apenas na região específica para a qual foi desenhado. *Primers* inespecíficos produzem amplificação de fragmentos de DNA que não correspondem à região-alvo. O comprimento do *primer* influencia a especificidade, bem como as temperaturas de *melting* e *annealing*. Quando maior o comprimento do *primer* mais específicas e maiores as temperaturas de *melting* e *annealing*.



Entretanto, *primers* muito grandes têm um custo elevado, pareiam mais lentamente e aumentam a probabilidade de ocorrência de formação de estruturas secundárias.

Assim sendo, a construção e definição de um par de *primers* a ser utilizado em um experimento específico requer uma série de cuidados e experiência. Ao final, os *primers* do teste em avaliação estão descritos no Quadro 1.

**Quadro 1** – Sequências de oligonucleotídeos marcados com fluorescência 6-FAM (5' *primer sense*) utilizadas nas reações de PCR multiplex tipo específica da região E7 do vírus HPV do teste em estudo.

Tipos	Nº de acesso no <i>Genbank</i>	Sequência dos <i>primers</i> (5'>3') região E7	Posição	Pares de base (n)
16	NC_001526	5' GATGAAATAGATGGTCCAGC 3' (6FAM) 5' GCTTTGTACGCACAACCGAAGC 3'	667-686 752-774	107
18	NC_001357	5' CGACGCAGAGAAACACAAGTAT 3' (6FAM) 5' ATTGTTGCTTACTGCTGGGAT 3'	558-579 895-915	357
31	J04353.1	5' GGCAACTGACCTCCACTG 3' (6FAM) 5' ACAGTTGGGGCACACGATT 3'	613-630 823-841	228
33	PPH33CG	5' CAGATGAGGATGAAGGCT 3' (6FAM) 5' GTAGTTGCTGTATGGTTCG 3'	667-684 801-819	152
45	EF202166	5' AGGCACGGCAAGAAAGACT 3' (6FAM) 5' TCTAAGGTCATCTGCCGAGC 3'	532-550 822-841	309
52	GQ472848	5' GACCTGTGACCCAAGTGTAAC 3' (6FAM) 5' GCCTCTACTTCAAACCAGCC 3'	529-549 909-928	400

*GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

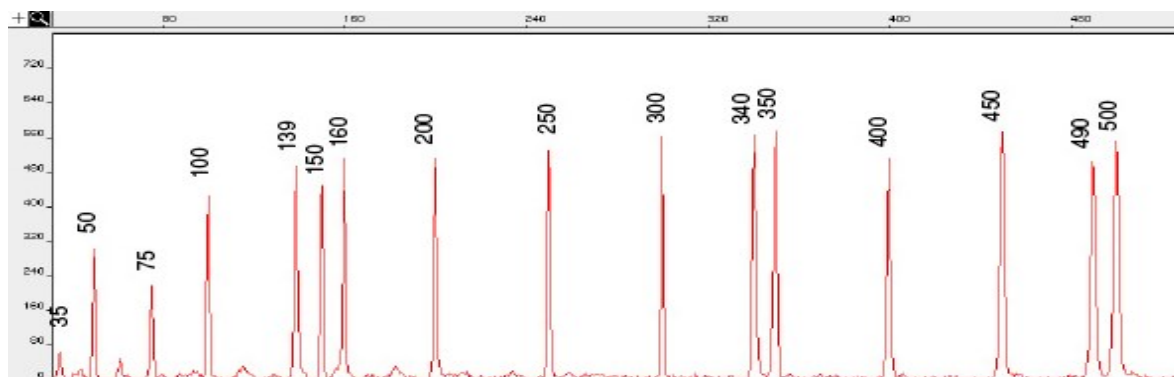
- ***Primers* tipo específico marcados com fluorocromo 6 FAM para PCR Multiplex**

Os HPVs tipos 16, 18, 31, 33, 45 e 52 foram determinados em reações de amplificação m-PCR, utilizando os *primers* específicos marcados com fluorocromo 6 FAM na extremidade 5' para cada tipo de HPV. Para a reação de amplificação do DNA (m-PCR) foram elaboradas misturas de reagentes para 15µl contendo: 5 Unidades de Taq Platinum DNA polimerase, 0,25mM desoxirribonucleotídeo (dNTPs), tampão 10x concentrado, 4mM MgCl<sub>2</sub>, e 0,2pmol de cada *primer* e 50ng de DNA. Na fase inicial, para desnaturação, a temperatura foi de 95°C por 2 minutos. Foram realizados 35 ciclos de amplificação e cada ciclo incluiu: 15 segundos a 95°C para desnaturação, 20 segundos a 64°C para ligação dos *primers* ao DNA e 1 minuto a 72°C para a extensão do amplicon. Na fase final, manteve-se a temperatura de 72°C por 7 minutos para polimerização dos fragmentos incompletos.

- **Eletroforese Capilar**

Um microlitro do produto da PCR foi adicionado a uma mistura de 9 µl de formamida e 0,2 µl de marcador de peso molecular LIZ 500 antes da desnaturação (85° C por 3 minutos). Em seguida foi colocado no ABI 3500XL (*Applied Biosystems* ®) de 24 capilares, cujos capilares foram previamente preenchidos com Polímero POP7 (tempo de execução mínimo, 18 min). O ABI 3500XL permite as seguintes combinações de fluorocromos: Dye Set D – para combinação de *primers* marcados com 6-FAM, HEX, NED e o Dye Set DS-33 – para combinação de *primers* marcados com 6-FAM, VIC, NED e PET. O marcador de peso

molecular compatível com este set é o GeneScan 500 LIZ (*Invitrogen-Life Technologies®*), que possui fragmentos que variam de 35 a 500pb, indicados para fragmentos que tenham no mínimo 70pb, para garantir uma análise mais acurada (Figura 3).

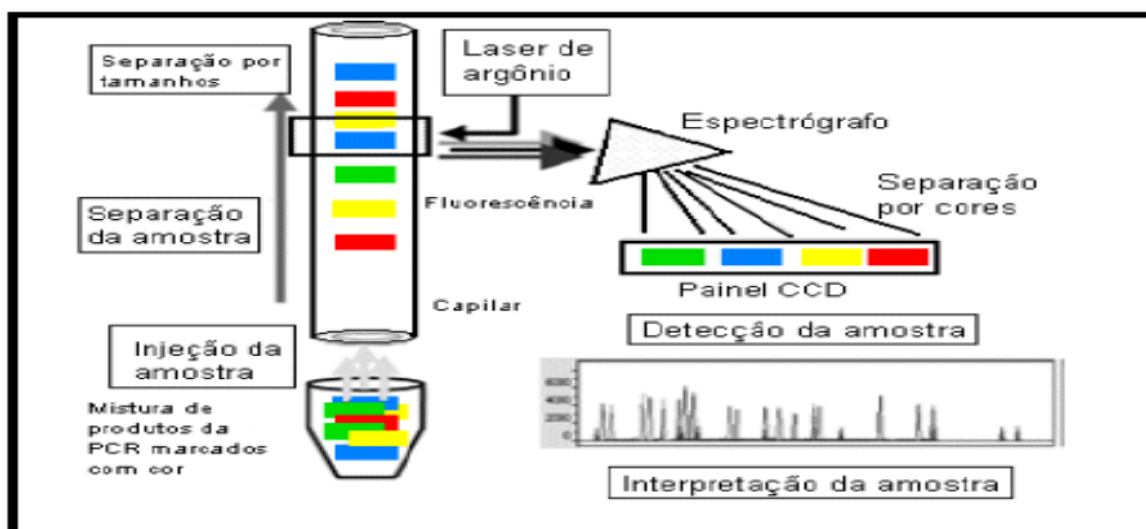


**Figura 3** – Eletroferograma do marcador de peso molecular GeneScan 500 LIZ (35-500bp), que é emitido pelo sequenciador ao término da leitura.

Em geral, três a quatro PCRs diferentes podem ser misturadas para serem corridas em um mesmo capilar, contanto que tenham sido marcadas com fluorocromos de cores diferentes. Se tiverem a mesma cor, devem ter tamanhos diferentes. É possível correr mais de quatro PCRs no mesmo capilar, mas o ideal é fazer um teste antes para verificar se as PCRs estão limpas e não têm fragmentos inespecíficos que podem interferir na análise de outro marcador. O *software* para análise usa o marcador de peso molecular (LIZ 500) para criar uma curva para cada capilar analisado, gerando uma análise individual e precisa.

A PCR multiplex com os 6 tipos de HPV foram misturados juntamente com o marcador GeneScan 500 LIZ da Applied Biosystems, em cada orifício da placa e corridas em um mesmo capilar. Isso foi possível devido à marcação do *primer* com

fluorocromo 6-FAM gerando amplicons de tamanhos diferentes (107, 357, 228, 152, 309, 400). Na Figura 4 pode ser observado um esquema com etapas da eletroforese capilar em sequenciador automático.



**Figura 4** – Esquema das etapas de funcionamento da Eletroforese Capilar em Sequenciador Automático ABI 3500XL.

A injeção das amostras foi feita durante 30 segundos com carga elétrica de 3KV e a corrida eletroforética foi conduzida durante 20 minutos com carga elétrica de 9KV. Os dados obtidos das 60 amostras corridas foram analisados, através da interpretação dos eletroferogramas, utilizando o *software* GeneMapper® ID-X Versão 1.2. A partir dos arquivos de saída do programa, foram feitas as análises genéticas e comparadas com o método padrão disponível, realizado visualmente.

Os controles positivos consistiram em amostras coletadas de pacientes não incluídas neste estudo, processadas em condições similares, com infecção por HPV com tipos virais conhecidos e único tipo, *a priori*. Controles negativos consistiram em água livre de DNase e RNase. Nos produtos da reação

submetidos à eletroforese capilar, visualizamos picos de fluorescência com tamanhos diferentes de acordo com o tamanho de cada amplicon de cada tipo específico de HPV, ao invés de bandas como é mostrado em gel de agarose.

### **3.4.3 Teste de referência: *cobas*<sup>®</sup> HPV Test**

O *cobas*<sup>®</sup> HPV Test detecta 12 hrHPV em grupo e faz genotipagem dos tipos 16 e 18, separadamente, e também amplifica o gene da  $\beta$ -globina como controle interno do teste. O teste extrai o DNA celular do HPV e amplifica por PCR em tempo real, utilizando pares de *primers* específicos para  $\beta$ -globina e o HPV. A detecção dos amplicons é realizada utilizando sondas marcadas com corantes fluorescentes diferentes. Os 12 hrHPVs são detectados usando o mesmo corante fluorescente, enquanto que os sinais do HPV16, HPV18 e da  $\beta$ -globina são detectados por fluoróforos diferentes. O MC utilizado para o *cobas*<sup>®</sup> HPV Test da Roche foi o meio *SurePath*<sup>®</sup> que permite a preservação de células para avaliação citológica (66).

## **3.5. Coleta, processamento dos dados e análise estatística**

Os resultados foram registrados em uma ficha pré-codificada (ANEXO 7) que, posteriormente, possibilitou a digitação e montagem de um banco de dados para a análise estatística.

Segundo o roteiro pré-definido para a validação inicial do teste para HPV, considerou-se uma boa concordância entre os resultados dos testes 'E7-HPV' e *cobas*<sup>®</sup>, ao ser atingido um índice de concordância Kappa de 0,70 (51).

De acordo com Landis & Koch (67), de uma maneira geral, os valores do índice de concordância Kappa correspondem a:

Kappa  $> 0,79$  → concordância quase perfeita

Kappa  $0,60 - 0,79$  → concordância substancial

Kappa  $0,40 - 0,59$  → concordância mediana

Kappa  $< 0,40$  → baixa concordância

Posteriormente, com todos os resultados dos dois testes de HPV, o banco de dados foi montado pelo Orientador, que realizou a comparação caso a caso, e as discrepâncias encontradas foram revisadas, realizados exames complementares ou confirmatórios até se conseguir um banco de dados final.

### **3.6. Aspectos éticos**

Este estudo foi desenvolvido utilizando a ocasião de comparecimento de mulheres com ou sem patologias relacionadas ao HPV no atendimento de rotina do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti, CAISM, UNICAMP, e que tinham um exame ginecológico especular programado para o seu atendimento.

Previamente a qualquer procedimento neste estudo, as mulheres selecionadas foram orientadas a respeito da proposta desta pesquisa e, para participar, confirmaram sua concordância assinando um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, ANEXO 6), antes do momento da realização de exame ginecológico especular. A coleta de amostras da região do colo do útero para a realização dos testes desta pesquisa acrescentou alguns segundos no tempo da

realização do exame ginecológico padrão, sem acréscimo significativo de inconvenientes. As amostras coletadas foram identificadas com número de registro da participante no estudo, não havendo possibilidade de identificação da mesma por pessoa que não fez parte da pesquisa.

Os testes de HPV ainda não são utilizados na prática clínica como triagem ou para a definição de tratamento. Uma cópia do resultado do teste de referência foi arquivada no prontuário hospitalar de cada uma das 55 participantes com NIC e esta informação não foi utilizada na rotina para definição de conduta, mas, sabe-se que este resultado poderá servir de referência para comparação com testes futuros, se realizados no seguimento. Atualmente, há evidência de que um teste de hrHPV negativo no seguimento de pacientes tratadas por NIC2+ tem um alto valor preditivo negativo, ou seja, indica um risco de recidiva desprezível, podendo ser utilizado como critério de cura (42). Entre as cinco participantes com citologia e colposcopia negativas, não houve resultado do teste de referência positivo para hrHPV, não necessitando de procedimentos adicionais previstos no protocolo, como convocação e orientação, caso o teste fosse positivo para hrHPV.

O pesquisador checou os resultados e preencheu as fichas pré-codificadas (ANEXO 7) que foram ordenadas numericamente para arquivamento, mantendo o sigilo da origem dos dados, pois as participantes foram identificadas apenas com número de ordem. Em todo o estudo foram respeitados os princípios enunciados na Declaração de Helsinki (68) e as diretrizes e normas contidas na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (69).





## 4. RESULTADOS

### a. PCR Multiplex com *primers* específicos

- O método padronizado para execução do teste ‘E7-HPV’ na detecção de DNA de hrHPV com genotipagem de seis tipos está descrita detalhadamente em “Procedimentos do Estudo” e o tempo necessário, dificuldades e ajustes realizados estão descritos no QUADRO 2:

**QUADRO 2** – Teste ‘E7-HPV’: tempo decorrido por fase e quantidade de amostras analisadas, dificuldades detectadas e ajustes realizados.

<b>Fase</b>	<b>Tempo decorrido /nº. de amostras</b>	<b>Dificuldades e ajustes</b>
<b>Extração de DNA das amostras</b>	4h/20	
<b>Quantificação de DNA</b>	20min/20	
<b>PCR Multiplex com <i>primers</i> tipo específico marcados com 6 FAM</b>	1h30min / 60	Padronização de controle positivo
<b>Eletroforese capilar</b>	1h/60	Disponibilidade do Sequenciador. Testagem com diluições diferentes.

O tempo total previsto para a realização de 20 amostras ficou em aproximadamente sete horas. O método padronizado apresenta etapas possíveis de serem executadas em laboratórios de rotina biomolecular. Os *primers* específicos desenhados e marcados por fluorescência foram testados inicialmente em amostras sabidamente com tipo de HPV conhecido e tiveram um desempenho adequado na detecção e genotipagem dos HPV.

- Os resultados obtidos pela eletroforese capilar realizada em sequenciador automático da m-PCR para hrHPV foram visualizados no Software GeneMapper® ID-X Version 1.2 (*Life Technologies*).

#### **b. Comparação do desempenho do teste ‘E7-HPV’ com o *cobas*®**

A concordância dos resultados entre os testes na detecção de HPV16 foi alta com Kappa de 0,972 e conforme pode ser observado na Tabela 1. O único caso discordante foi o caso 28 (ANEXO 4), cuja lesão histopatológica no momento da coleta era NIC3, e o *cobas*® foi negativo e o teste ‘E7-HPV’ apresentou resultado positivo.

**Tabela 1** – Concordância entre os testes ‘E7-HPV’ e *cobas*<sup>®</sup> (referência) na detecção do HPV16 em amostras cervicouterinas.

‘E7-HPV’ (HPV16)	<i>cobas</i> <sup>®</sup> (HPV16)		<i>Total</i>
	Negativo	Positivo	
Negativo	39	0	39
Positivo	1	20	21
<i>Total</i>	40	20	60

Kappa = 0,972

Para o HPV18, os resultados dos testes ‘E7-HPV’ e *cobas*<sup>®</sup> demonstraram concordância total, com índice Kappa=1,0 (Tabela 2).

**Tabela 2** – Concordância entre os testes ‘E7-HPV’ e *cobas*<sup>®</sup> (referência) na detecção do HPV18 em amostras cervicouterinas.

‘E7-HPV’ (HPV18)	<i>cobas</i> <sup>®</sup> (HPV18)		<i>Total</i>
	Negativo	Positivo	
Negativo	54	0	54
Positivo	0	6	6
<i>Total</i>	54	6	60

Kappa = 1,0

Na comparação de detecção dos tipos hrHPV **não 16 e 18**, seis casos foram positivos para o *cobas*<sup>®</sup> e negativos para o ‘E7-HPV’ (Tabela 3). Como isto poderia ter sido resultante do *cobas*<sup>®</sup> detectar tipos de HPV não contemplados no ‘E7-HPV’, foram realizados exames complementares para esclarecimento, descritos mais adiante e mostrados no Quadro 3. Ao contrário, o teste ‘E7-HPV’ detectou dois hrHPVs adicionais em que o *cobas*<sup>®</sup> foi negativo nos casos 21 e 29 (ANEXO 4), mesmo na repetição do *cobas*<sup>®</sup> para confirmação dos resultados (Quadro 3).

**Tabela 3** – Concordância entre os testes ‘E7-HPV’ e *cobas*<sup>®</sup> (referência) na detecção de hrHPV, exceto os tipos HPV16 e HPV18 em amostras cervicouterinas.

	<i>cobas</i> <sup>®</sup>		
	(12 hrHPV)		
‘E7-HPV’ (HPV31, 33, 45, 52)	Negativo	Positivo	<i>Total</i>
Negativo	32	6	38
Positivo	2	20	22
<i>Total</i>	34	26	60

Kappa = 0,83

hrHPV: HPV de alto risco oncogênico.

Na Tabela 4 pode ser observado desempenhos iguais para os dois testes na detecção de NIC1+ ou NIC2+.

**Tabela 4** – Desempenho dos testes ‘E7-HPV’ e *cobas*<sup>®</sup> (referência) no diagnóstico de NIC1+ ou NIC2+.

Teste de hrHPV	Diagnóstico final (n=60)			
	NIC1+		NIC2+	
	Não (n=7)	Sim (n=53)	Não (n=11)	Sim (n=49)
<i>cobas</i> <sup>®</sup> (14 vírus)				
Negativo	5	13	8	10 <sup>#</sup>
Positivo	2	40	3*	39
‘E7-HPV’ (6 vírus)				
Negativo	5	13	8	10 <sup>#</sup>
Positivo	2	40	3*	39

hrHPV: HPV de alto risco oncogênico.

NIC1+ / NIC2+: neoplasia intraepitelial de colo grau 1 ou pior / grau 2 ou pior.

<sup>#</sup>Três casos não coincidentes entre os testes.

\*Os mesmos casos para os dois testes.

### **c. Validação inicial do teste 'E7-HPV' em comparação ao *cobas*<sup>®</sup>**

#### **(referência) na determinação de NIC2+**

Avaliando os resultados caso a caso foi observada uma alta concordância para os dois testes (ANEXO 4). Os resultados inicialmente discordantes estão mostrados no Quadro 3, onde pode ser observado que o teste 'E7-HPV' não apresentou falhas de detecção em relação ao *cobas*<sup>®</sup>, e adicionou a detecção de hrHPV em três casos *cobas*<sup>®</sup> negativo (*cobas*<sup>®</sup> realizado duas vezes em alíquotas diferentes da mesma amostra, confirmando o resultado negativo): HPV52 (caso 21), HPV16 (caso 28) e HPV31 (caso 29). Para as seis amostras positivas para o *cobas*<sup>®</sup> e negativas para o 'E7-HPV', foram realizados testes confirmatórios através do teste *CLART*<sup>®</sup> que apresenta poder de detectar e identificar de 35 tipos de HPV. O teste *CLART*<sup>®</sup> detectou a presença de outro hrHPV diferente dos seis tipos genotipados pelo 'E7-HPV' em cinco casos, sendo três deles com infecção concomitante pelo HPV16, detectados pelos três testes ('E7-HPV', *cobas*<sup>®</sup> e *CLART*<sup>®</sup>). Permaneceu um caso (caso 30) com *cobas*<sup>®</sup> positivo (hrHPV não 16/18) e testes 'E7-HPV' e *CLART*<sup>®</sup> negativos, sem explicação aparente, podendo tratar-se de diferenças na sensibilidade de detecção entre os testes (Quadro 3) ou diferenças entre amostras.

**QUADRO 3:** Descrição dos resultados discordantes entre os testes ‘E7-HPV’ e

Caso	Idade	Diagnóstico Final	Resultado do teste			Comentário
			<i>cobas</i> <sup>®</sup>	‘E7-HPV’	Confirmatório*	
21	26	NIC2	Neg	HPV52+	<i>cobas</i> <sup>®</sup> negativo	Melhor para teste em estudo
28	43	NIC3	Neg	HPV16+	<i>cobas</i> <sup>®</sup> negativo	
29	47	NIC3	Neg	HPV31+	<i>cobas</i> <sup>®</sup> negativo	
30	40	NIC3	hrHPV+ (não 16-18)	Neg	<i>CLART</i> <sup>®</sup> : negativo	‘Sem explicação aparente. Diferenças na sensibilidade de detecção ou entre amostragem.
34	34	NIC2	hrHPV+ (não 16/18)	Neg	<i>CLART</i> <sup>®</sup> : HPV51+	hrHPV diferente dos 6 tipos avaliados no ‘E7-HPV’
52	48	NIC2	hrHPV+ (não 16/18)	Neg	<i>CLART</i> <sup>®</sup> : HPV39+	
31	29	NIC3	hrHPV+ e HPV16+	HPV16+	<i>CLART</i> <sup>®</sup> : HPV16+ e HPV58+	HPV16 detectado em todos os testes. hrHPV diferente dos 6 tipos avaliados no ‘E7-HPV’
37	41	NIC3	hrHPV+ e HPV16+	HPV16+	<i>CLART</i> <sup>®</sup> : HPV16+ e HPV35+	
58	29	NIC3	hrHPV+ e HPV16+	HPV16+	<i>CLART</i> <sup>®</sup> : HPV16+ e HPV51+	

*cobas*<sup>®</sup>.

\* testes realizados em alíquotas diferentes da mesma amostra.

*Teste CLART<sup>®</sup> (Genomica): PCR DNA-Microarray; Sensibilidade analítica: 50 - 100 cópias/amostra. Detecção: hrHPV-16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 85. E IrHPV06, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 83, 84, 89.*

*cobas<sup>®</sup> (Roche): PCR Real Time; Sensibilidade: 80 cópias virais/ml. Detecção: hrHPVs 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68 (pesquisados em conjunto). E genotipagem específica do HPV16 e HPV18.*



## 5. DISCUSSÃO

O método de execução do teste 'E7-HPV' na detecção de DNA de hrHPV foi definido, padronizado e testado com um desempenho equivalente ao *cobas<sup>®</sup> HPV Test* de referência, tanto na detecção de HPV16 e/ou 18, quanto de outros hrHPVs, em amostras obtidas da região do colo do útero de mulheres com lesões NIC2+, cumprindo com os pré-requisitos iniciais do processo de validação (51).

O desenvolvimento do teste 'E7-HPV' partiu da premissa de se produzir um teste de fácil realização, em tempo menor e com custo reduzido. Já prevendo uma maior aplicação de testes biomoleculares no rastreamento e o efeito da vacinação contra HPV na prevalência dos tipos virais na população, foi considerada uma ampliação no número de vírus genotipados, visando a uma adequação à possibilidade de diagnosticar infecções persistentes para definição de risco futuro (19).

A maior parte dos testes disponíveis realizam a detecção de hrHPVs agrupados e alguns testes fazem a genotipagem dos HPV16 e 18. Para o teste em estudo foi definida a genotipagem de seis HPVs, ou seja, com certa limitação em número, mas objetivando permitir o seguimento para caracterização de infecção persistente e também para diminuir a complexidade do teste. Os hrHPVs genotipados pelo teste 'E7-HPV' (tipos 16, 18, 31, 33, 45 e 52) foram definidos com base na prevalência dos mesmos, tanto em câncer de colo de útero quanto

na população (12, 13, 16). Particularmente, a genotipagem do HPV52 foi definida pela sua relativa maior prevalência na população brasileira (17, 18, 70).

Assim, o teste 'E7-HPV' foi definido com características que resultam em adequada aplicabilidade em rastreamento primário, principalmente na futura população vacinada, onde há a perspectiva de que a citologia tradicional fique em segundo plano.

Dentre as características do teste destaca-se o desenho dos *primers* baseados na região E7 do HPV, possibilitando a detecção de DNA viral já integrado e evitando falsos negativos decorrentes de rupturas na região E1 – L1 durante o processo de integração, alvo de grande parte dos testes disponíveis (8, 71).

Antes de iniciar a avaliação do 'E7-HPV' foi analisado se o meio de conservação PBS (pH 7.2), que foi utilizado para armazenar as amostras coletadas do colo do útero de mulheres atendidas no CAISM, para a realização do teste 'E7 HPV', fosse adequado para realização do teste de referência. O *cobas*<sup>®</sup> utiliza um meio de conservação licenciado (SurePath), que também possibilita realização de citologia (66). As primeiras 20 amostras coletadas foram colocadas nos dois meios de conservação e realizado o teste *cobas*<sup>®</sup>, que apresentou resultados iguais para os dois meios. Esta avaliação possibilita que amostras já coletadas e conservadas em PBS de outras pesquisas possam ser testadas pelo *cobas*<sup>®</sup>, no futuro, e se o teste em estudo não for validado, sem riscos de perdas. Neste estudo, foi apenas avaliado se o PBS preservaria o DNA. Não avaliamos se o mesmo preserva a célula para realização de uma citologia posterior.

O desenho minucioso dos *primers* tipo específico, exceto do HPV16, foi realizado no Laboratório local. Em todos, foi adicionado o fluorocromo 6-FAM que possibilitou uma leitura automatizada em sequenciador de DNA, eliminando qualquer subjetividade na avaliação dos resultados. A utilização deste sistema decorreu do alto poder discriminatório entre os diversos tipos de HPV na genotipagem quando processados conjuntamente (40).

O teste 'E7-HPV', em avaliação, foi realizado com processo automatizado de eletroforese capilar (ABI 3500XL), 20 amostras a cada 20 minutos. Durante o desenvolver desta pesquisa houve certa dificuldade na fase final para conseguirmos a utilização do sequenciador de DNA, parte do processo que diferencia o 'E7-HPV', mas, ao final, a espera pela avaliação das amostras pelo teste em estudo no sequenciador de DNA foi recompensada com resultados excelentes.

Há de ser destacado que os dois testes foram realizados em laboratórios diferentes sem conhecimento de informações clínicas, e com resultados desconhecidos para o outro. Somente após todos os resultados estarem disponíveis foi realizada a comparação caso a caso pelo orientador.

Durante o processo de desenvolvimento do teste, houve o cuidado de se avaliar a qualidade das amostras com a detecção da  $\beta$ -globina que foi 100% positiva, indicando a presença de DNA genômico; e para avaliação dos *primers* as amostras foram testadas em duplicata por eletroforese em gel de agarose para análise em paralelo à eletroforese capilar, e os resultados expressos foram 100% concordantes. Todos os ensaios foram incluídos, controles negativos e controles positivos.

Na comparação, o teste 'E7-HPV' teve um desempenho adequado, sem perdas em relação ao *cobas*<sup>®</sup> na detecção de HPV16 e/ou 18 ( $Kappa \geq 0,97$  e sensibilidade de 100% da referência para NIC2+). Adicionalmente, o teste em estudo identificou hrHPV em três casos de NIC2+ (HPV16, 31 e 52) em que o *cobas*<sup>®</sup> foi negativo, incluindo uma repetição confirmatória.

Sabidamente, os principais HPVs oncogênicos são os HPVs 16 e 18, prevalentes em 50% das lesões NIC2+ e em 70% do câncer de colo de útero (16). Os demais tipos de hrHPVs não 16/18, menos prevalentes na gênese do câncer de colo de útero, são detectados de forma agrupada pelo teste de referência *cobas*<sup>®</sup> HPV Test (12 tipos). Diferentemente, o teste em estudo detecta e identifica isoladamente, outros quatro tipos.

Ao ser avaliada a identificação dos hrHPVs não 16/18, pelos dois testes, também houve uma boa concordância ( $Kappa = 0,83$ ). Por outro lado, houve três casos de hrHPV não 16 ou 18 positivos pelo *cobas*<sup>®</sup> e negativos pelo teste 'E7-HPV', o que provavelmente ocorreu devido ao maior número de hrHPVs detectados pelo *cobas*<sup>®</sup> (12 *versus* 4) e conforme confirmado em dois casos pelo *CLART*<sup>®</sup>. Quanto ao terceiro caso, uma explicação possível para ter havido *CLART*<sup>®</sup> e E7-HPV negativos com *cobas*<sup>®</sup> positivo, poderia ser diferenças na sensibilidade de detecção de cada teste ou entre amostras analisadas.

Um menor número de tipos de hrHPVs detectáveis pelo teste 'E7-HPV' poderia ser considerado uma limitação, mas isto pode ser compensado pela genotipagem oferecida para seis tipos de hrHPV (16, 18, 31, 33, 45 e 52), tipos relativamente mais importantes para definição de risco que outros hrHPVs, de

acordo com a prevalência de cada tipo no total de câncer de colo, avaliados em amostras mundiais (16).

Outra vantagem proporcionada pela genotipagem é a possibilidade de utilização prática na definição de uma infecção persistente pelo mesmo tipo de HPV no seguimento de mulheres, que é considerada o principal fator de risco relacionado no desenvolvimento e evolução das lesões precursoras até o câncer de colo (19).

Para o futuro, a vacinação populacional de meninas contra HPV16-18 iniciada no Brasil em 2014, com previsão de alta cobertura, certamente resultará em uma população futura com menos vírus, particularmente os HPVs 16 e 18, o que poderia ser um ponto importante para a aplicabilidade de um teste que identifica separadamente outros hrHPVs diferentes dos HPVs16/18 (58).

De qualquer forma, era preciso definir uma composição de detecção de hrHPV que parecesse ser útil e ao mesmo tempo, factível. Para o momento, sabemos que é possível acrescentar outros tipos para genotipagem no futuro, se for o caso.

Outro ponto previsto em relação ao teste 'E7-HPV' é o custo reduzido, que devido a utilização de técnica de eletroforese capilar com marcador fluorocromo, foi possível observar um alto desempenho aliado à perspectiva de um baixo custo final. Isto pode ser considerado um ponto forte deste teste, uma vez que há restrições de acesso aos testes disponíveis, devido ao custo elevado ou à sua não incorporação na rotina de programas oficiais de rastreamento. Ao final, este estudo-piloto conseguiu definir um método padrão para o teste em desenvolvimento, um teste biomolecular com capacidade adequada para

identificação e genotipagem de seis hrHPVs em amostras cervicais de mulheres com lesões precursoras de câncer de colo de útero. Os resultados iniciais apresentados cumprem os pré-requisitos definidos pelo guia internacional que orienta o desenvolvimento e análise de novos testes, apresentando alta concordância e sensibilidade adequada em comparação ao teste de referência, e com razoável perspectiva de ser obtido um rápido processamento das amostras com baixo custo, sinalizando importante possibilidade de aplicabilidade futura a nível populacional (51).

Novos estudos, com maior número de amostras, incluindo mulheres de baixo risco, testando o desempenho na triagem de lesões precursoras em base populacional, procurando desenvolver e adicionar fases automatizadas, ou o desenvolvimento de *kits* padronizados, que resultem em diminuir tanto a possibilidade de interferências pessoais quanto o custo final, são os próximos passos lógicos, mas, que demandará esforços e apoios adicionais.

## 6. CONCLUSÕES

- **6.1.** O método de execução do teste em estudo para a detecção de DNA de hrHPV foi definida, testada e padronizada.
- **6.2.** O desempenho do teste em desenvolvimento 'E7-HPV' demonstrou ser, pelo menos, igual ao teste *cobas*<sup>®</sup> (referência) na detecção de HPV16 ou 18 em amostras obtidas da região do colo do útero de pacientes com lesões NIC2 ou pior.
- **6.3.** A concordância entre os testes 'E7-HPV' e *cobas*<sup>®</sup> (referência) na detecção de hrHPV não 16 ou 18, manteve-se alta ( $Kappa=0,83$ ), apesar da diferença no número de hrHPV testados (4 *versus* 12).
- **6.4.** A sensibilidade alcançada pelo teste em estudo na detecção de NIC2+ nas mulheres avaliadas foi a mesma apresentada pelo teste de referência.
- **6.5.** De acordo com o roteiro internacional para desenvolvimento de novos testes de HPV para rastreamento utilizado, os resultados satisfatórios apresentados nesta primeira fase de avaliação do teste 'E7-HPV', cumpriram com os critérios exigidos (concordância mínima,  $Kappa=0,7$  e mais de 90% da sensibilidade apresentada pelo teste de referência na detecção de NIC2+), permitindo sua validação inicial e possibilitando a continuidade do processo de desenvolvimento do mesmo.





## 7. REFERÊNCIAS

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893-917.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69-90.
3. Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 3:S3/11-25.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2014: incidência de câncer do colo do útero no Brasil. [database on the Internet]. [cited 17 jul 2014]. Available from: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home++/colo\\_uterio/definicao](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home++/colo_uterio/definicao)
5. Grce M, Davies P. Human papillomavirus testing for primary cervical cancer screening. *Expert Rev Mol Diagn*. 2008;8(5):599-605.
6. Behtash N, Mehrdad N. Cervical cancer: screening and prevention. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2006;7(4):683-6.
7. Vale DB, Morais SS, Pimenta AL, Zeferino LC. Assessment of the cervical cancer screening in the Family Health Strategy in Amparo, São Paulo State, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2010;26(2):383-90.

8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189(1):12-9.
9. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine.* 2006;24 Suppl 3:S3/1-10.
10. Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet.* 2002;359(9312):1093-101.
11. Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH, Glass AG, Rush BB, Scott DR, et al. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis.* 1993;20(5):274-8.
12. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(7):453-9.
13. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(6):518-27.
14. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F et al. A review of human carcinogens - Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* 2009;10(4):321-2.
15. Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol.* 1992;79(3):328-37.

16. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 2010;11(11):1048-56.
17. Pernambuco de Souza E. Epidemiologia da infecção genital por HPV e anormalidades na citologia cervical em mulheres jovens brasileiras [Tese-Doutorado]. Campinas(SP): Universidade Estadual de Campinas; 2004.
18. Resende LS, Rabelo-Santos SH, Sarian LO, Figueiredo Alves RR, Ribeiro AA, Zeferino LC et al. A portrait of single and multiple HPV type infections in Brazilian women of different age strata with squamous or glandular cervical lesions. *BMC Infect Dis.* 2014;14:214.
19. Kjaer SK, van den Brule AJ, Paull G, Svare EI, Sherman ME, Thomsen BL et al. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *BMJ.* 2002;325(7364):572.
20. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(1):1-17.
21. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324(1):17-27.
22. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* 2010;401(1):70-9.

23. Kajitani N, Satsuka A, Kawate A, Sakai H. Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation. *Front Microbiol.* 2012;3:152.
24. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005;32 Suppl 1:S7-15.
25. Hellner K, Münger K. Human papillomaviruses as therapeutic targets in human cancer. *Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2011;29(13):1785-94.
26. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68(2):362-72.
27. Moody CA, Fradet-Turcotte A, Archambault J, Laimins LA. Human papillomaviruses activate caspases upon epithelial differentiation to induce viral genome amplification. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(49):19541-6.
28. Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene.* 2003;22(33):5201-7.
29. Alba A, Cararach M, Rodriguez-Cerdeira. The Human Papillomavirus (HPV) in Human Pathology: Description, Pathogenesis, oncogenic Role, Epidemiology and Section Techniques. *The Open Dermatology Journal.* 2009:90-102.
30. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology.* 1992;24:17-27.
31. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am.* 1990;262(4):56-61, 4-5.

32. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985;230(4732):1350-4.
33. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239(4839):487-91.
34. Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*. 2013;133(3):e6.
35. Baumforth KR, Nelson PN, Digby JE, O'Neil JD, Murray PG. Demystified the polymerase chain reaction. *Mol Pathol*. 1999;52(1):1-10.
36. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(23):11141-56.
37. Gauffre B, Galan M, Bretagnolle V, Cosson JF. Polymorphic microsatellite loci and PCR multiplexing in the common vole, *Microtus arvalis*. *Mol Ecol*. 2007;17(5):830-2.
38. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal*. 2002;16(1):47-51.
39. Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*. 1997;23(3):504-11.
40. Gupta V, Dorsey G, Hubbard AE, Rosenthal PJ, Greenhouse B. Gel versus capillary electrophoresis genotyping for categorizing treatment outcomes in two anti-malarial trials in Uganda. *Malar J*. 2010;9:19.

41. Missiaggia A, Grattapaglia D. Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers. *Genet Mol Res.* 2006;5(1):72-8.
42. Cox JT. History of the use of HPV testing in cervical screening and in the management of abnormal cervical screening results. *J Clin Virol.* 2009;45 Suppl 1:S3-S12.
43. FDA. Approval letter for Hybrid Capture 2 HPV test. MAR 31 2003. In: SERVICES DOHaH, editor. 2003.
44. Group A-LTSA. Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188(6):1383-92.
45. Ki EY, Kim HE, Choi YJ, Park JS, Kang CS, Lee A. Comparison of the Cobas 4800 HPV test and the Seeplex HPV4A ACE with the hybrid capture 2 test. *Int J Med Sci.* 2013;10(2):119-23.
46. Castle PE, Stoler MH, Wright TC, Sharma A, Wright TL, Behrens CM. Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: a subanalysis of the ATHENA study. *Lancet Oncol.* 2011;12(9):880-90.
47. Austin RM, Zhao C. Is 58% sensitivity for detection of cervical intraepithelial neoplasia 3 and invasive cervical cancer optimal for cervical screening? *Cytojournal.* 2014;11:14.
48. FDA approves first human papillomavirus test for primary cervical cancer screening. Apr 24 2014 [database on the Internet].[cited 12 jan 2015]. Available from: [http://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf10/P100020S008a.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf10/P100020S008a.pdf)

49. Cuzick J, Cadman L, Mesher D, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L et al. Comparing the performance of six human papillomavirus tests in a screening population. *British Journal of Cancer*. 2013;108(4):908-13.
50. Szarewski A, Mesher D, Cadman L, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L et al. Comparison of seven tests for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears: the Predictors 2 study. *J Clin Microbiol*. 2012;50(6):1867-73.
51. Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G et al. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer*. 2009;124(3):516-20.
52. Naud PS, Roteli-Martins CM, De Carvalho NS, Teixeira JC, de Borja PC, Sanchez N, et al. Sustained efficacy, immunogenicity, and safety of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine: final analysis of a long-term follow-up study up to 9.4 years post-vaccination. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(8).
53. Dillner J, Kjaer SK, Wheeler CM, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, et al. Four year efficacy of prophylactic human papillomavirus quadrivalent vaccine against low grade cervical, vulvar, and vaginal intraepithelial neoplasia and anogenital warts: randomised controlled trial. *BMJ*. 2010;341:c3493.
54. Roteli-Martins CM, Naud P, De Borja P, Teixeira JC, De Carvalho NS, Zahaf T et al. Sustained immunogenicity and efficacy of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine: up to 8.4 years of follow-up. *Hum Vaccin Immunother*. 2012;8(3):390-7.
55. Schwarz TF, Huang LM, Medina DM, Valencia A, Lin TY, Behre U et al. Four-year follow-up of the immunogenicity and safety of the HPV-16/18 AS04-

- adjuvanted vaccine when administered to adolescent girls aged 10-14 years. *J Adolesc Health*. 2012;50(2):187-94.
56. Brotherton JM, Fridman M, May CL, Chappell G, Saville AM, Gertig DM. Early effect of the HPV vaccination programme on cervical abnormalities in Victoria, Australia: an ecological study. *Lancet*. 2011;377(9783):2085-92.
57. Tota JE, Ramana-Kumar AV, El-Khatib Z, Franco EL. The road ahead for cervical cancer prevention and control. *Curr Oncol*. 2014;21(2):e255-64.
58. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Vacina/HPV no Brasil. [database on the Internet]. 2014 [cited 17 jul 2014]. Available from: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2014/tem\\_inicio\\_vacinacao\\_contra\\_hpv](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2014/tem_inicio_vacinacao_contra_hpv)
59. Lehtinen M, Paavonen J, Wheeler CM, Jaisamrarn U, Garland SM, Castellsagué X et al. Overall efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against grade 3 or greater cervical intraepithelial neoplasia: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(1):89-99.
60. Franco EL, Cuzick J. Cervical cancer screening following prophylactic human papillomavirus vaccination. *Vaccine*. 2008;26 Suppl 1:A16-23.
61. FDA. Approval letter for Cobas HPV test. Apr 19 2011 [database on the Internet]. [cited 05 jun 2013]. Available from: [http://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf10/p100020a.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf10/p100020a.pdf)
62. Wong AA, Fuller J, Pabbaraju K, Wong S, Zahariadis G. Comparison of the hybrid capture 2 and cobas 4800 tests for detection of high-risk human papillomavirus in specimens collected in PreservCyt medium. *J Clin Microbiol*. 2012;50(1):25-9.



63. Pista A, Verdasca N, Oliveira A. Desempenho clínico do CLART ensaio papilomavírus humano 2, em comparação com o teste de Captura Híbrida 2. J Med Virol. 2011 Feb; 83 (2): 272-6.
64. Genrunner. Hastings Software, version 3.00. Disponível em:  
<http://www.generunner.com>
65. GenBank. NIH genetic sequence database. Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>.
66. Preisler S, Rebolj M, Untermann A, Ejegod DM, Lynge E, Rygaard C et al. Prevalence of human papillomavirus in 5,072 consecutive cervical SurePath samples evaluated with the Roche cobas HPV real-time PCR assay. PLoS One. 2013;8(3):e59765.
67. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 1977;33(1):159-74.
68. Declaração de Helsinque. Princípios éticos para as pesquisas médicas em seres humanos. Disponível em:<[http://www.anis.org.br/Cd01/Comum/DocInternacionais/doc\\_int\\_03\\_declaracao\\_helsinque\\_port.pdf](http://www.anis.org.br/Cd01/Comum/DocInternacionais/doc_int_03_declaracao_helsinque_port.pdf)> Acesso em: 30 mar 2013.
69. Brasil. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Resolução 196/96. Disponível em:<[http://conselho.saude.gov.br/web\\_comissoes/conep/arquivos/resolucoes/23\\_out\\_versao\\_final\\_196\\_ENCEP2012.pdf](http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/arquivos/resolucoes/23_out_versao_final_196_ENCEP2012.pdf)>. Acesso em: 30 mar 2013.
70. Hesselink AT, Berkhof J, van der Salm M, van Splunter AP, Geelen TH, van Kemenade FJ et al. Clinical validation of the HPV-Risk Assay, a novel real-time

PCR assay for detection of high-risk human papillomavirus DNA by targeting the E7 region. J Clin Microbiol.2014; 52:890-6.

71. Roteli-Martins CM, de Carvalho NS, Naud P, Teixeira J, Borba P, Derchain S et al. Prevalence of human papillomavirus infection and associated risk factors in young women in Brazil, Canada, and the United States: a multicenter cross-sectional study. Int J Gynecol Pathol. 2011;30:173-84.

## 8. ANEXOS

### 8.1. ANEXO 1 - Quadro A1 - Testes de HPV validados e disponíveis para uso clínico, no mundo (49).

Nome	Técnica	HPV detectados	Fabricante	Aprovação <i>FDA</i>
<b><i>Hybrid Capture 2</i></b>	Hibridização	13 hrHPV (grupo)	Qiagen	Sim
<b><i>cobas<sup>®</sup> HPV Test</i></b>	PCR genotipagem	12 hrHPV (grupo) 16 e 18	Roche	Sim
<b><i>Aptima</i></b>	Hibridização	E7 mRNA de 14 hrHPV (grupo)	Gen-Probe	Sim
<b><i>Cervista</i></b>	Hibridização genotipagem	14 hrHPV (grupo) 16 e 18	Hologic	Sim
<b><i>RealTime PCR</i></b>	PCR genotipagem	14 hrHPV (grupo) 16 e 18	Abbott	Não
<b><i>Papillocheck</i></b>	PCR com 24 genotipagem	6 hrHPV e 18 hrHPV	Greiner BioOne	Não

## 8.2. ANEXO 2 - Roteiro original para desenvolvimento de teste de HPV, segundo Meijer CJ *et al* (51).

### Validation guidelines for candidate HPV assays

It is obvious from the requirements outlined above that validation of a candidate assay for clinical application in cervical screening requires a comparative analysis with a clinically validated reference HPV test on samples that originate from a population-based screening cohort.

The following validation strategy is advised:

1. The sensitivity of the candidate test for  $\geq$ CIN2 should be at least 90% of the sensitivity of the hc2 (i.e. relative sensitivity of at least 90%) as assessed by a non-inferiority score test (31). A description of the non-inferiority test is given in the Appendix. Samples should be derived from a representative set of women in a population-based screening cohort, tested by hc2, either or not combined with cytology, and the candidate test that had a histologically confirmed  $\geq$ CIN2 detected through either of these tests. The non-inferiority test has been shown to perform well if the number of samples is 50 or more. The power of the non-inferiority test, obtained under the assumption that the candidate test and the reference test have equal sensitivity and that the agreement between the tests is moderate/good (kappa value of 0.7), is presented in Figure 1. To achieve a power of 80%, 60 samples should be tested with both the new test and hc2. The power increases with the sample size and is greater than 99% when 100 samples are tested.
2. The specificity of the candidate test for  $\geq$ CIN 2 should be at least 98% of the specificity of hc2. This should be determined by applying the non-inferiority test to a random sample of women of at least 30 years of age from a population-based screening cohort, tested by hc2, either or not combined with cytology, and the candidate test and that did not have histologically confirmed  $\geq$ CIN 2. To achieve a power of 80% under the assumption that the new test and the reference test have equal specificity and that the agreement between the tests is moderate/good (kappa value of 0.7), a sample size of 800 samples is required. When 2500 samples are tested, the power is greater than 99% (Figure 1).
3. The intra-laboratory reproducibility in time and inter-laboratory agreement should be determined by evaluation of at least 500 samples, 30% of which tested positive in a reference laboratory using a clinically validated assay. This should result in a percentage of agreement with a lower confidence bound not less than 87% (kappa value of at least 0.5 in this series of samples including 30% positives). The same intra-laboratory reproducibility should be reached after testing the same set of samples several weeks later.

All the above mentioned samples can be obtained either through new studies where women are tested by hc2, either or not combined with cytology, or by exploiting well preserved archived material from previously conducted studies with the described features as long as this material is qualitatively adequate for applying the candidate test (26).

## Appendix

### Non-inferiority test

Suppose  $n$  samples have been tested with the new test and the hc2 reference test. The results are presented in Table 2.

Table 2

Test results	hc2 +	hc2 –	Total
New test +	$a$	$b$	$a+b$
New test –	$c$	$d$	$c+d$
Total	$a+c$	$b+d$	$n$

Under the null hypothesis, the relative sensitivity (when comparing the new test to hc2) is  $\delta_0$  and under the alternative hypothesis, the relative sensitivity is greater than  $\delta_0$ . According to the present guidelines  $\delta_0$  should be set to 0.90 for sensitivity and to 0.98 for specificity. The test statistic is defined as

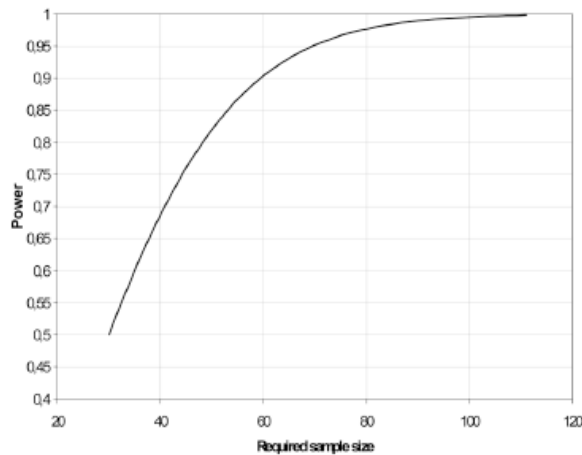
$$T = \frac{a+b - (a+c)\delta_0}{\sqrt{n[(1+\delta_0)f + (a+b+c)(\delta_0 - 1)/n]}}$$

where

$$f = \frac{\sqrt{B^2 - 4AC} - B}{2A},$$

with  $A = n(1 + \delta_0)$ ,  $B = (a + c)\delta_0^2 - (a + b + 2c)$ , and  $C = c(1 - \delta_0)(a + b + c)/n$ . The null hypothesis is rejected at nominal significance level  $\alpha$  if  $T$  is equal to or greater than the  $100 \times (1 - \alpha)$  percentile point of the standard normal distribution ( $T$  is interpreted as a  $z$  statistic).

(a) Relative sensitivity greater than 90%



(b) Relative specificity greater than 98%

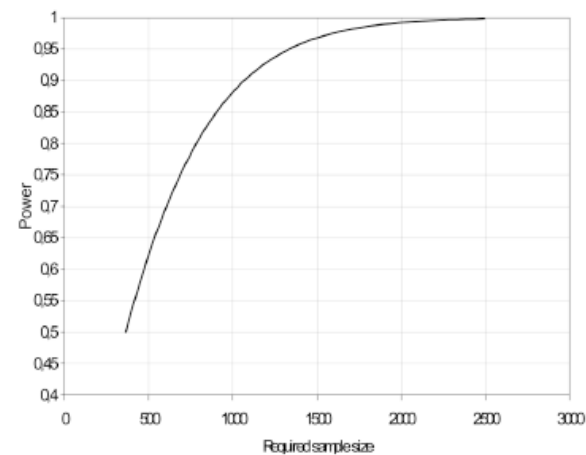


Figure 1.

Power of the non-inferiority score test for assessing a relative sensitivity greater than 0.9 (a) or a relative specificity greater than 0.98. It is assumed that the new test and the reference test have equal sensitivities (specificities) and moderate/good agreement ( $\kappa=0.7$ ).

**8.3. ANEXO 3 - Listagem para designação de numeração dos tubos para a coleta das amostras.**

Participante		Tubo		Conservação		Teste HPV
No.	Diag	Nº.		Meio	Modo	
1	N2+	1		Surepath	rotina	Ref
		2	A	PBS	congelado	Ref
			B	PBS	congelado	Estudo
2	N2+	3		Surepath	rotina	Ref
		4	A	PBS	congelado	Ref
			B	PBS	congelado	Estudo
3	N2+	5		Surepath	rotina	Ref
		6	A	PBS	congelado	Ref
			B	PBS	congelado	Estudo
4	N2+	7		Surepath	rotina	Ref
		8	A	PBS	congelado	Ref
			B	PBS	congelado	Estudo
5	Neg	9		Surepath	rotina	Ref
		10	A	PBS	rotina	Ref
			B	PBS	congelado	Estudo
6	N2+	11		Surepath	rotina	Ref
		12	A	PBS	congelado	Ref
			B	PBS	congelado	Estudo
7	N2+	13		Surepath	rotina	Ref
		14	A	PBS	congelado	Ref
			B	PBS	congelado	Estudo
8	N2+	15		Surepath	rotina	Ref
		16	A	PBS	congelado	Ref
			B	PBS	congelado	Estudo
9	N2+	17		Surepath	rotina	Ref
		18	A	PBS	congelado	Ref
			B	PBS	congelado	Estudo
10	Neg	19		Surepath	rotina	Ref
		20	A	PBS	rotina	Ref
			B	PBS	congelado	Estudo
11	N2+	21	A	PBS	congelado	Ref
			B	PBS	congelado	Estudo
		22		Surepath	rotina	Ref
12	N2+	23	A	PBS	congelado	Ref

Participante		Tubo Nº.		Conservação		Teste HPV
No.	Diag			Meio	Modo	
			B	PBS	congelado	Estudo
		24		Surepath	rotina	Ref
13	Neg	25	A	PBS	rotina	Ref
			B	PBS	congelado	Estudo
		26		Surepath	rotina	Ref
14	N2+	27	A	PBS	rotina	Ref
			B	PBS	congelado	Estudo
		28		Surepath	rotina	Ref
15	N2+	29	A	PBS	rotina	Ref
			B	PBS	congelado	Estudo
		30		Surepath	rotina	Ref
16	Neg	31	A	PBS	rotina	Ref
			B	PBS	congelado	Estudo
		32		Surepath	rotina	Ref
17	N2+	33	A	PBS	rotina	Ref
			B	PBS	congelado	Estudo
		34		Surepath	rotina	Ref
18	N2+	35	A	PBS	rotina	Ref
			B	PBS	congelado	Estudo
		36		Surepath	rotina	Ref
19	Neg	37	A	PBS	rotina	Ref
			B	PBS	congelado	Estudo
		38		Surepath	rotina	Ref
20	N2+	39	A	PBS	rotina	Ref
			B	PBS	congelado	Estudo
		40		Surepath	rotina	Ref

#### 8.4. ANEXO 4. Banco de dados obtidos

Caso	Citologia	Histopatológico final		Procedimento Final	Data da Coleta	Cobas®				Gel de Agarose*	Teste 'E7-HPV'		Reteste
		Data	Resultado			12 hrHPV	HPV 16	HPV 18	MC (PBS)		Resultado	HPV	
1	AG/ ASC-H	22/07/2013	NIC 3	LEEP	22/07/2013	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg		
2	AG/ ASC-H	22/07/2013	NIC 1	LEEP	22/07/2013	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg		
3	AG/ ASC-H	22/07/2013	NIC 2	LEEP	22/07/2013	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg		
4	AG/ ASC-H	13/05/2013	NIC 3	LEEP	24/07/2013	Pos	Neg	Neg	hrHPV+ não 16/18	31	hrHPV+ não 16/18	31	
5	BG/ ASC-US	29/07/2013	NIC 3	LEEP	29/07/2013	Neg	Pos	Pos	16 e 18	16 e 18	16 e 18		
6	AG/ ASC-H	29/07/2013	NIC 2	LEEP	24/07/2013	Pos	Neg	Neg	hrHPV+ não 16/18	52	hrHPV+ não 16/18	52	
7	Neg	NR			07/08/2013	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg		
8	AG/ ASC-H	21/10/2013	NIC 3	LEEP	31/07/2013	Pos	Neg	Neg	hrHPV+ não 16/18	33	hrHPV+ não 16/18	33	
9	AG/ ASC-H	05/08/2013	NIC 3	LEEP	05/08/2013	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg		
10	Neg	NR			14/08/2013	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg		
11	AG/ ASC-H	18/11/2013	NIC 3	LEEP	07/08/2013	Pos	Neg	Neg	hrHPV+ não 16/18	33	hrHPV+ não 16/18	33	
12	AG/ ASC-H	NR			09/08/2013	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg		
13	Neg	NR			16/08/2013	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg		
14	AG/ ASC-H	12/08/2013	NIC 1	LEEP	12/08/2013	Neg	Neg	Pos	Pos 18	18	18		
15	BG/ ASC-US	12/08/2013	NIC 3	LEEP	12/08/2013	Neg	Neg	Pos	Pos 18	18	18		
16	Neg	NR			19/08/2013	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg		
17	AG/ ASC-H	12/08/2013	Metaplasia Imatura	LEEP	12/08/2013	Pos	Neg	Neg	hrHPV+ não 16/18	31	hrHPV+ não 16/18	31	
18	AG/ ASC-H	12/08/2013	NIC 3	LEEP	12/08/2013	Pos	Neg	Neg	hrHPV+ não 16/18	33	hrHPV+ não 16/18	33	



Caso	Citologia	Histopatológico final		Procedimento Final	Data da Coleta	Cobas®				Gel de Agarose*	Teste 'E7-HPV'		Reteste
		Data	Resultado			12 hrHPV	HPV 16	HPV 18	MC (PBS)		Resultado	HPV	
19	Neg	NR			16/08/2013	Pos	Neg	Neg	hrHPV+ não 16/18	52	hrHPV+ não 16/18	52	
20	AG/ ASC-H	19/11/2013	Microinvasor	Histerectomia	14/08/2013	Neg	Neg	Pos	Pos 18	18	18		
21	AG/ ASC-H	30/09/2013	NIC 2	LEEP	19/08/2013	Neg	Neg	Neg		52	hrHPV+ não 16/18	52	cobas® Neg
22	AG/ ASC-H	19/08/2013	NIC 2	LEEP	19/08/2013	Pos	Pos	Neg		16,33,52	16 (33, 52)	33, 52	
23	BG/ ASC-US	19/08/2013	NIC 1	LEEP	19/08/2013	Neg	Neg	Neg		Neg	Neg		
24	AG/ ASC-H	19/08/2013	NIC 3	LEEP	19/08/2013	Pos	Neg	Neg		52	hrHPV+ não 16/18 18	52	
25	AG/ ASC-H	19/08/2013	NIC 3	Histerectomia	19/08/2013	Pos	Neg	Neg		33	hrHPV+ não 16/18	33	
26	AG/ ASC-H	09/12/2013	NIC 3	LEEP (NIC3)	21/08/2013	Pos	Pos	Neg		16, 52	16 (52)	52	
27	AG/ ASC-H	13/01/2014	NIC 2	LEEP	21/08/2013	Neg	Neg	Neg		Neg	Neg		
28	AG/ ASC-H	16/09/2013	NIC 3	LEEP	23/08/2013	Neg	Neg	Neg		16	16		cobas® Neg
29	AG/ ASC-H	26/082013	NIC 3	LEEP	26/08/2013	Neg	Neg	Neg		31	hrHPV+ não 16/18	31	cobas® Neg
30	AG/ ASC-H	26/08/2013	NIC 3	LEEP (NIC3)	26/08/2013	Pos	Neg	Neg		Neg	Neg		CLART® Neg
31	AG/ ASC-H	26/08/2013	NIC 3	LEEP	26/08/2013	Pos	Pos	Neg		16/ 58	16		
32	BG/ ASC-US	16/12/2013	NIC 3	LEEP (NIC3)	28/08/2013	Pos	Pos	Neg		16, 31	16 (31)	31	
33	AG/ ASC-H	28/08/2013	NIC 2	biopsia	28/08/2013	Pos	Neg	Neg		31	hrHPV+ não 16/18	31	
34	AG/ ASC-H	06/01/2014	NIC 2	LEEP (NIC2)	30/08/2013	Pos	Neg	Neg		Neg	Neg		CLART® 51
35	AG/ ASC-H	22/04/2013	NIC 3	NIC 3	02/09/2013	Neg	Neg	Neg		Neg	Neg		

Caso	Citologia	Histopatológico final		Procedimento Final	Data da Coleta	Cobas®				Gel de Agarose*	Teste 'E7-HPV'		Reteste
		Data	Resultado			12 hrHPV	HPV 16	HPV 18	MC (PBS)		Resultado	HPV	
36	AG/ ASC-H	02/09/2013	Microinvasor	Histerectomia	02/09/2013	Neg	Neg	Pos		18	18		
37	AG/ ASC-H	02/09/2013	NIC 3	LEEP (NIC3)	02/09/2013	Pos	Pos	Neg		16/ 35	16		
38	AG/ ASC-H	04/09/2013	NIC 2	Biopsia	04/09/2013	Pos	Neg	Pos		18, 33	18 (33)	33	
39	BG/ ASC-US	04/11/2013	NIC 1	LEEP	04/09/2013	Neg	Neg	Neg		Neg	Neg		
40	AG/ ASC-H	22/11/2013	Invasor	Wertheim Meigs	04/09/2013	Neg	Pos	Neg		16	16		
41	AG/ ASC-H	09/09/2013	NIC 3	LEEP	09/09/2013	Neg	Pos	Neg		16	16		
42	AG/ ASC-H	09/09/2013	NIC 3	LEEP	09/09/2013	Pos	Neg	Neg		33, 52	hrHPV+ não 16/18	33 52	
43	AG/ ASC-H	09/09/2013	Microinvasor	Histerectomia	09/09/2013	Neg	Pos	Neg		16	16		
44	AG/ ASC-H	09/09/2013	NIC 3	LEEP (NIC1 focal)	09/09/2013	Neg	Neg	Neg		Neg	Neg		
45	AG/ ASC-H	09/09/2013	NIC 3	LEEP	09/09/2013	Neg	Pos	Neg		16	16		
46	Invasor	05/12/2013	Invasor	Cone frio	11/09/2013	Neg	Pos	Neg		16	16		
47	AG/ ASC-H	04/11/2013	NIC 3	LEEP	11/09/2013	Neg	Pos	Neg		16	16		
48	AG/ ASC-H	25/11/2013	NIC 3	LEEP	09/09/2013	Pos	Pos	Neg		16, 52	16 (52)	52	
49	AG/ ASC-H	16/09/2013	NIC 3	LEEP	16/09/2013	Neg	Pos	Neg		16	16		
50	AG/ ASC-H	16/09/2013	NIC 3	LEEP	16/09/2013	Neg	Pos	Neg		16	16		
51	AG/ ASC-H	16/09/2013	Microinvasor	LEEP	16/09/2013	Pos	Pos	Neg		16, 52	16 (52)	52	
52	AG/ ASC-H	16/09/2013	NIC 2	LEEP (NIC2)	16/09/2013	Pos	Neg	Neg		Neg/ 39	Neg		
53	BG/ ASC-US	01/03/2013	NIC 2	LEEP	18/09/2013	Neg	Neg	Neg		Neg	Neg		
54	AG/ ASC-H	23/09/2013	NIC 3	LEEP	23/09/2013	Neg	Pos	Neg		16	16		
55	AG/ ASC-H	23/09/2013	NIC 3	LEEP	23/09/2013	Pos	Neg	Neg		31	hrHPV+ não 16/18	31	
56	AG/ ASC-H	23/09/2013	NIC 3	LEEP	23/09/2013	Neg	Pos	Neg		16	16		

Caso	Citologia	Histopatológico final		Procedimento Final	Data da Coleta	Cobas®				Gel de Agarose*	Teste 'E7-HPV'		Reteste
		Data	Resultado			12 hrHPV	HPV 16	HPV 18	MC (PBS)		Resultado	HPV	
57	AG/ ASC-H	23/09/2013	NIC 3	LEEP	23/09/2013	Pos	Neg	Neg		33	hrHPV+ não 16/18	33	
58	AG/ ASC-H	23/09/2013	NIC 3	LEEP	23/09/2013	Pos	Pos	Neg		16	16		CLART® 16/51
59	AG/ ASC-H	13/09/2013	NIC 3	LEEP	30/09/2013	Pos	Neg	Neg		31	hrHPV+ não 16/18	31	
60	AG/ ASC-H	30/09/2013	NIC 3	LEEP	30/09/2013	Neg	Pos	Neg		16	16		

\*O teste 'E7-HPV' foi realizado em duplicada com leitura em gel de agarose e com os mesmos resultados da leitura em gel capilar.

Teste CLART® (Genomica): PCR DNA-Microarray; Sensibilidade analítica: 50 - 100 cópias/amostra. Detecção: hrHPVs 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 85. E IrHPV06, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 83, 84, 89.

cobas® (Roche): PCR Real Time; Sensibilidade: 80 cópias virais/ml. Detecção: hrHPVs 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68 (pesquisados em conjunto). E genotipagem específica do HPV16 e HPV18NR=não realizado; MC= meio de conservação; Neg= negativo; Pos=positivo.

## 8.5. ANEXO 5 - Avaliação do meio de conservação.

A CONCORDÂNCIA DOS RESULTADOS PARA O TESTE DE REFERÊNCIA (COBAS®) DE ACORDO COM O MC UTILIZADO E SE CONGELADO OU NÃO, ESTÁ MOSTRADA NA TABELA A1:

Tabela A1 – Concordância entre os resultados do teste *cobas*® (referência) realizado em 20 pacientes de acordo com o meio de conservação (MC) das amostras cervicais coletadas.

	Teste HPV em MC licenciado				
Teste HPV em MC em estudo	Negativo	Positivo			<i><b>Total</b></i>
		HPV16	HPV18	Outros HPV	
Negativo	9				9
HPV16+		1			1
HPV18+			4		4
Outros HPV+	1			7	8
<i><b>Total</b></i>	<i><b>10</b></i>	<i><b>1</b></i>	<i><b>4</b></i>	<i><b>7</b></i>	<i><b>22</b></i>

MC licenciado: *Surepath*®, solução comercial, validada, para o teste e equipamento *cobas*® HPV Test da Roche, mantida em temperatura ambiente ou geladeira.

MC em avaliação: PBS, solução tampão fosfato-alcalino, preparada localmente e conservada também congelada.

Existem dois casos com mais de um HPV detectado. Um Caso detectou HPV16 e 18 nos dois MC e outro, detectou HPV18 no dois MC com “Outro hrHPV+” apenas no MC em avaliação.

Kappa (para HPV16 e 18) = 1,00 Kappa (geral) = 0,99

A conservação de amostras cervicais - se no MC licenciado (*Surepath*®) ou em avaliação (PBS) e ainda, se mantidas em geladeira ou congeladas por até 30 dias -, não interferiu na possibilidade de realização e no resultado do teste *cobas*® (referência). Amostras conservadas em PBS e congeladas mantiveram-se adequadas para a realização do teste *cobas*®.

## 8.6. ANEXO 6 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### Título do Estudo:

*Desenvolvimento de um teste biomolecular para detecção de HPV em amostras cervicouterinas: descrição do método e avaliação inicial.*

**Pesquisador (Médico do estudo):** Dr. Júlio César Teixeira  
**Nome da Instituição:** Hospital da Mulher / CAISM – Unicamp – Campinas/SP  
**Endereço do local da pesquisa:** Rua Alexander Fleming, 101 – CEP 13083-970 - Campinas/SP  
**Telefone / Fax:** (19) 3521 9228

### Justificativa, objetivo e planejamento do estudo:

#### Por que este estudo está sendo realizado?

O *Papilomavírus humano*, o HPV, é um vírus que causa uma infecção comum da pele e das partes íntimas (genitália). Diversos tipos de infecção por HPV são transmitidos por atividade sexual e podem infectar o colo do útero (a parte inferior do útero ou ventre) nas mulheres. Estima-se que até o final da vida, sete de cada dez mulheres terão contato com algum tipo de HPV. Importante ressaltar que esta frequente infecção, geralmente, se cura sozinha na maioria das mulheres. Mas em algumas mulheres, a infecção pode persistir por um longo tempo e levar ao câncer do colo do útero após 15 anos, em média. O conhecimento das características deste vírus propiciou o desenvolvimento de medidas preventivas, como testes para detecção de HPV e vacinas que previnem infecções por alguns dos tipos mais relacionados ao câncer.

No momento, na maioria dos países, inclusive no Brasil, é utilizado o exame preventivo através de citologia, o conhecido exame de Papanicolaou, que realizado periodicamente em mulheres, tem a capacidade de detectar alterações citológicas compatíveis com lesões pré-câncer e, uma vez detectadas e tratadas, evita-se o risco de surgir um câncer no colo do útero. Mesmo com tudo isto, os testes preventivos podem falhar ou não são realizados da melhor forma e ainda ocorre um grande número de casos de câncer que poderiam ser prevenidos.

Testes alternativos realizados para a detecção do HPV em amostras provenientes da região do colo uterino ou vagina são relativamente caros, com tecnologia complexa de serem realizados em laboratório, ainda não utilizados ou disponíveis pelo SUS. Muitos deles detectam vários tipos conjuntamente de HPVs, não tendo capacidade para identificar qual o tipo de HPV presente naquela amostra.

O Hospital da Mulher/CAISM, como você pode já ter conhecimento, realiza pesquisas para melhorar a saúde da mulher e, no momento, está desenvolvendo uma técnica para realização de um teste para detecção do HPV, que poderá ser muito útil no auxílio da prevenção de câncer de colo do útero nas mulheres.

Você está sendo atendida neste Hospital e existe a previsão de realizar exame ginecológico durante este atendimento. Se for o caso, será oferecida a atualização

do seu exame preventivo ou de Papanicolaou, e uma coleta adicional de secreção da mesma região do colo para fornecer material para realização do teste de HPV em desenvolvimento. Este material coletado é crucial para o desenvolvimento de testes que poderão ser úteis, para o futuro preventivo das mulheres.

### **Descrição dos procedimentos**

Será utilizado o mesmo momento de exame ginecológico previsto no seu atendimento agendado por motivos diversos, no Hospital da Mulher/CAISM. Durante o exame ginecológico, será coletada amostra para realização de dois testes de HPV, um que já existe disponível e outro que está em desenvolvimento na Unicamp. A coleta desta amostra é da mesma forma que a realizada para um exame de Papanicolaou na rotina.

### **Riscos associados com o estudo:**

O procedimento de coleta de amostra da secreção do colo do útero acrescentará cerca de um minuto ao tempo previsto para os seus procedimentos do atendimento agendado, sem acrescentar desconfortos importantes ou riscos.

### **Benefícios do estudo:**

O resultado do teste de HPV realizado será avaliado pelo médico da pesquisa que arquivará uma cópia no seu prontuário médico do hospital. Caso haja necessidade, você será solicitada a comparecer ao CAISM para que o médico do estudo explique o resultado e dê a orientação para a comunicação de seu médico pessoal com respeito à avaliação complementar. Importante ressaltar que é um direito seu, a realização de avaliações ou tratamentos complementares que estejam de acordo com as diretrizes oficiais do governo, os quais poderão ser realizados no próprio CAISM, em ambulatório específico, com agendamento orientado pelo médico responsável por esta pesquisa.

As visitas médicas e os exames relacionados ao estudo não serão cobrados.

Sua participação neste estudo ajudará a prover informações que serão úteis no desenvolvimento de um teste de HPV, que poderá ser utilizado como mais um instrumento na luta contra o câncer do colo do útero em mulheres.

### **Direito a fazer perguntas e/ou retirar-se do estudo**

Você pode fazer perguntas sobre o estudo e tem o direito de sair do mesmo a qualquer momento, sem fornecer um motivo. Sua decisão não afetará qualquer tratamento médico que você está recebendo ou que poderá receber, fora deste estudo. Você não está obrigada a participar da coleta de amostras adicionais da região do colo do útero para este estudo.

Se você tiver alguma dúvida, poderá entrar em contato com: Dr. Júlio César Teixeira, responsável geral por este estudo, nos telefones 3521-9228 ou 3521-9305 das 8 às 17 horas ou ligar a cobrar no celular 99735-2666 que está com um médico que tem conhecimento desta pesquisa, que poderá atendê-la em qualquer momento.

Em caso de dúvida sobre seus direitos como participante deste estudo clínico, você deve contatar o Comitê de Ética da Unicamp:

**Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Unicamp**  
**Rua Tessália Vieira de Camargo, 126**  
**13084-971 - Campinas/SP - Telefone: (19) 3521-8936 / Fax 3521-8925**

Sua participação será tratada com absoluto sigilo e seu nome não será mencionado nas solicitações de exames ou nos informes sobre o resultado deste estudo. Seus dados médicos ou amostras coletadas serão utilizados somente para avaliação local, na Unicamp, e para os propósitos deste estudo, não sendo enviados para outro lugar ou país ou armazenados.

Você fará todos os exames e procedimentos do estudo sem nenhum custo.

O pesquisador responsável declara ciência e cumprimento das exigências contidas nos itens IV.3 da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde e que termo é composto por duas vias e você receberá uma via após todos assinarem.

Vale a pena reforçar: os testes de HPV não substituem os exames preventivos de rotina. Mesmo que você não participe deste estudo, é recomendável continuar os exames de rotina de prevenção de câncer de colo do útero como padrão de cuidado. Os exames ginecológicos regulares são importantes para a detecção precoce de lesões pré-câncer e prevenir este câncer.

### **Declaração de consentimento**

Eu, \_\_\_\_\_  
(Nome completo da participante)

- Confirmo ter lido as informações por escrito e que os procedimentos do estudo foram explicados a mim pelo médico da pesquisa durante o processo de consentimento.
- Confirmo que tive a oportunidade de fazer perguntas a respeito deste estudo e estou satisfeita com as respostas e explicações fornecidas.
- Confirmo que tive tempo e oportunidade para refletir sobre a minha participação neste estudo.

Concordo em participar deste estudo.

Assinatura da  
Participante

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Nome do médico que  
conduziu o  
consentimento

\_\_\_\_\_

Assinatura do médico  
que conduziu o  
consentimento

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_



HC | | || | | | || | | | - | |

Ficha N<sup>o</sup>.|\_|\_|\_|\_|

Data TCLE      /      /      Data Nascto      /      /

Ficha N<sup>o</sup>.|\_|\_|\_|\_|

	Data	Resultado		Data	Resultado
Citologia		[N] neg	Colposcopia		
		[B] baixo grau/ASC-US			
		[A] alto grau/ASC-H			
		[Ad] AIS/AGC			
		[M] microinvas			
		[C] invasor			

	Data	Procedimento final	Resultado
<b>Anatomopatolog final</b>		(B) Biopsia	[N2] NIC2
		(L) LEEP	[N3] NIC3
		(C) Cone frio	[A] AIS
			[M] microinvas
			[C] invasor

Teste HPV	Coleta	Data	Meio conservação	Resultado	Genotipagem
<b>Referência</b> Tubo no.  __ __			[R] referência	[X] amostra inadequada [N] neg [hr] hrHPV+	[X] não aplicável [16] HPV16+ [18] HPV18+
<b>Referência</b> Tubo no.  __ __			[EN] estudo normal [EC] est. Congelado	X] amostra inadequada [N] neg [hr] hrHPV+	[X] não aplicável [16] HPV16+ [18] HPV18+
<b>Estudo</b> Tubo no.  __ __			[EC] est. congelado	[X] amostra inadequada [N] neg [h] hrHPV+	[X] não aplicável [16] HPV16+ [18] HPV18+ [ ] HPV- __ __

## 8.8. ANEXO 8 - Aprovação no CEP

FACULDADE DE CIENCIAS  
MEDICAS - UNICAMP  
(CAMPUS CAMPINAS)



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** TESTE PARA DETECÇÃO DE HPV: DESCRIÇÃO DO MÉTODO E AVALIAÇÃO INICIAL.

**Pesquisador:** Julio Cesar Teixeira

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 21093813.7.0000.5404

**Instituição Proponente:** Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - CAISM

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 556.817

**Data da Relatoria:** 20/03/2014

#### Apresentação do Projeto:

O pesquisador esclarece que testes biomoleculares para detecção do Papillomavírus humano (HPV) em amostras cérvico-vaginais tendem a ter um papel cada vez mais importante no rastreamento de lesões pré-câncer para o futuro e que, no momento, estes testes são de alto custo e de execução complexa. O presente estudo pretende desenvolver e padronizar um teste biomolecular para detecção de DNA de HRHPV em amostras obtidas da região cérvico-uterina e comparar com um teste de referência. O protocolo compreende duas fases, sendo que na primeira serão avaliadas 20 mulheres com ou sem lesões relacionadas, sendo os resultados obtidos comparados com um teste referência. Paralelamente, nesta fase, será validado o meio de conservação de amostras PBS, congelado, para a realização do teste referência. A segunda fase acontecerá depois de finalizada a padronização e descrição final do teste em estudo, e verificação de uma alta concordância na detecção de HPV em comparação ao teste referência ( $Kappa > 0,7$ ). Na segunda fase, serão acrescidas 40 avaliações com novas amostras de pacientes com NIC2+, para que se consiga a avaliação da sensibilidade do teste em estudo, conforme as diretrizes internacionais para desenvolvimento de testes de HPV. Uma vez alcançados os objetivos deste projeto e com resultados satisfatórios, haverá a possibilidade de registro do teste candidato e continuação do seu desenvolvimento através de teste clínico em amostras representativas da população. Visa

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
UF: SP Município: CAMPINAS  
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 556.817

também validar o meio de conservação PBS, para realização do teste Cobas 4800®, o que possibilitará que amostras de outros estudos mantidas armazenadas possam ser analisadas com resultados confiáveis.

**Objetivo da Pesquisa:**

Desenvolver e padronizar um teste biomolecular para detecção de DNA de HR-HPV em amostras obtidas da região cérvico-uterina e comparar com um teste de referência, além de validar o meio de conservação da amostra utilizado no teste em estudo e conservado congelado ou não, para a realização do teste referência em seu equipamento padronizado e validar o teste em estudo em comparação ao teste de referência na determinação de NIC2+.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Não há riscos relevantes, sendo mencionado apenas o desconforto do procedimento de coleta de amostra que deverá acrescentar alguns segundos no tempo para realização do exame ginecológico padrão. Os benefícios coletivos se referem ao desenvolvimento de um novo método para diagnóstico do HPV que poderá ser implantado futuramente. Em termos de benefícios diretos, se por ventura alguma participante do grupo "negativo" apresentar o teste referência positivo para HR-HPV, apesar da citologia e colposcopia negativas terem sido critério de inclusão, esta participante será convocada para receber uma cópia do resultado e orientada a respeito do mesmo e a manter sua rotina preventiva através de citologia, com nova avaliação em um ano, com seu médico pessoal. Uma cópia do resultado será arquivada no prontuário hospitalar de cada uma das participantes negativas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O estudo é bem estruturado quanto aos métodos e tem grande potencial de benefício coletivo. A redação do projeto demonstra que houve preocupação do pesquisador com os aspectos éticos do estudo e não há participação de população vulnerável e todos os sujeitos de pesquisa serão maiores de idade. Existem algumas pequenas correções no TCLE e esclarecimento sobre o cronograma, listados abaixo. Por fim, há previsão de aluno de pós-graduação ser vinculado ao projeto - o que deverá ser notificado ao CEP se efetivamente ocorrer.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Folha de rosto corretamente preenchida e assinada pelo pesquisador e pela responsável do local onde as participantes serão recrutadas (Diretora Associada do CAISM/Unicamp). Resumo das informações do estudo geradas pela PB com todos os itens corretamente preenchidos, indicando orçamento de R\$ 12.400,00 a ser arcado por financiamento próprio, além de cronograma

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
UF: SP Município: CAMPINAS  
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 556.817

indicando procedimentos com os sujeitos de pesquisa a partir de abril de 2014. O projeto da PB foi complementado por brochura do pesquisador, além de folha de assinaturas dos envolvidos e parecer de aprovação emitido pela comissão de pesquisa do DTG/FCM. O TCLE é bastante detalhado e contempla as exigências da resolução 466/2012.

**Recomendações:**

-

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

No parecer anterior (540.800), as seguintes pendências haviam sido listadas:

1. No resumo das informações geradas pela PB o cronograma descreve procedimentos com os sujeitos de pesquisa no ano de 2013. Esclarecer se o estudo foi efetivamente iniciado antes da aprovação pelo CEP, contrariando o compromisso do pesquisador em cumprir a resolução 466/2012 CNS/MS em seu artigo XI.2 "a".

Comentário: pendência atendida.

2. No TCLE, acrescentar uma frase que assegure que o participante da pesquisa receberá uma via deste documento (resolução 466/2012, artigo IV.3 "f").

Comentário: pendência atendida.

3. No TCLE, acrescentar a declaração do pesquisador responsável no cumprimento das exigências contidas nos itens IV. 3 (idem, artigo IV.5 "a").

Comentário: pendência atendida.

4. No TCLE, no espaço destinado para rubrica, lembramos que deverá conter tanto a rubrica do convidado a participar da pesquisa, ou seu representante legal, quanto do pesquisador responsável (idem, artigo IV.5 "d").

Comentário: pendência atendida.

Conclusão: Aprovado após respostas às pendências.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
UF: SP Município: CAMPINAS  
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS  
MEDICAS - UNICAMP  
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 556.817

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Apresentar a este CEP, oportunamente, os relatórios parciais e final da presente pesquisa.

CAMPINAS, 14 de Março de 2014

---

Assinador por:  
Fátima Aparecida Bottcher Luiz  
(Coordenador)

## 8.9. ANEXO 9 - Artigo submetido

### **Julio Teixeira**

---

**De:** <asm@msubmit.net>  
**Data:** domingo, 25 de janeiro de 2015 01:06  
**Para:** <juliotex@fcm.unicamp.br>  
**Cc:** <juliotex@uol.com.br>  
**Assunto:** JCM00188-15: Manuscript Received

Dear Prof. Teixeira,

On January 24, 2015, we received the manuscript "Development of a multiplex PCR with automated genotyping targeting E7 region for detection of six high-risk Human Papillomavirus" by Eliana Paes, Julio Teixeira, Angela de Assis, Cirbia Teixeira, and Francisco Aoki. The submission form indicates that this paper should be processed as a(n) Full-Length Text intended for publication in the section Immunoassays.

The manuscript has been assigned the control number JCM00188-15. Take note of this number, and refer to it in any correspondence with the Journals Department or with the editor.

You can check the status of this manuscript by clicking on the link below and selecting Check Status:

[http://jcm.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?  
el=A7GN5jFZ6A2CLdA1F6A9ftdApYQ0W6Yj17oVv6CJc3KUAZ](http://jcm.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?el=A7GN5jFZ6A2CLdA1F6A9ftdApYQ0W6Yj17oVv6CJc3KUAZ)

All authors must disclose any commercial affiliations as well as consultancies, stock or equity interests, and patent-licensing arrangements that could be considered to pose a conflict of interest regarding the submitted manuscript. All funding sources for the project, institutional and corporate, and any potentially conflicting interests, such as relationships that might detract from an author's objectivity in presentation of study results, must be acknowledged, both in the Acknowledgments section and on this form. The corresponding author must review this policy with all coauthors.

The author submitting the manuscript must state in the submission form whether or not any of the authors has a conflict of interest. Here is how Prof. Teixeira responded:

Conflict of Interest: No conflict of interest.

If you have a conflict of interest that is not disclosed here, please notify the journal staff immediately at [cbrown@asmusa.org](mailto:cbrown@asmusa.org)

To find contact information for the editor handling your manuscript, go to the following URL:

[http://www.asm.org//components/com\\_php/files/editors.php](http://www.asm.org//components/com_php/files/editors.php)

Thank you for submitting your work to Journal of Clinical Microbiology.

Regards,  
JCM staff

25/01/2015

***Development of a multiplex PCR with automated genotyping targeting E7 region for detection of six high-risk Human Papillomavirus***

Eliana Ferreira Paes,<sup>a</sup> Julio Cesar Teixeira,<sup>a#</sup> Angela Maria de Assis,<sup>b</sup> Cirbia S. Campos Teixeira,<sup>a</sup> Francisco Hideo Aoki<sup>b</sup>

Department of Obstetrics and Gynaecology, School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil<sup>a</sup>, Laboratory of Research in AIDS, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil<sup>b</sup>

Running title: Multiplex PCR and genotyping for detection of hr-HPV

#Address correspondence to Julio Cesar Teixeira, [juliotex@fcm.unicamp.br](mailto:juliotex@fcm.unicamp.br)

**Abstract**

Cervical cancer is caused by high-risk HPV and viral detection tests aid in the diagnosis of precursor lesions. In the present study, a biomolecular test ('E7-HPV') for the detection of high-risk HPV DNA was standardized and initially assessed in samples of women with lesions. The development of E7-HPV test for detection and genotyping of six high-risk HPV (types 16, 18, 31, 33, 45 and 52), consisted in adjusting multiplex PCR and evaluation of primer quality to obtain an adequate test. Primer design was based on region E7 of each HPV and the fluorochrome 6-FAM was added as a marker. Viral detection was performed by capillary electrophoresis in automated sequencer in samples obtained from 60 women, 55 with ASCH/HSIL cytology, from August to September 2013. A non-inferiority analysis was conducted in relation to the cobas<sup>®</sup> HPV Test, following international guidelines for the development of new tests. The methodology of E7-HPV test was standardized. Tests had a high concordance rate in HPV16 detection (Kappa=0.972), with only one discordant case (CIN3 with negative cobas<sup>®</sup> and 'E7-HPV' HPV16 positive) and total concordance in HPV18 detection. When comparing detection of all high-risk HPV, three cases were positive for cobas<sup>®</sup> and negative

for 'E7-HPV' and others three cases were 'E7-HPV' positive (HPV16, 31 and 52) with negative cobas<sup>®</sup>. For diagnosis of CIN2 or worse, both tests had the same sensitivity. In conclusion, the E7-HPV test was standardized, with satisfactory initial results, fulfilling the clinical validation criteria requested, and its development can be continued.

## **Introduction**

Cervical cancer is caused by persistent infection with high-risk human Papillomavirus (hrHPV) (1, 2). The presence of hrHPV DNA can be detected by biomolecular tests using brush cervical samples to screen women at risk. These tests help identify high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) more efficiently than traditional cytology, and some tests have already been approved for screening (3-5).

Validation of new tests used for cervical cancer screening may be achieved by demonstrating non-inferiority of clinical performance, in comparison to validated tests in large-scale high-cost studies, such as those performed for Hybrid Capture 2<sup>®</sup> (HC2) (6). With this purpose, in 2009 experts proposed international guidelines on the evaluation of a clinical equivalence of a new test (7).

The majority of existing biomolecular assays for HPV-DNA detection are targeted at regions L1 of the virus and some target regions E6 or E7 (8, 9). A new test ('E7-HPV') is being developed, using multiplex PCR (m-PCR) with fluorochrome-labeled primers, based on region E7, for DNA detection and genotyping of six hrHPV (types 16, 18, 31, 33, 45 and 52).

In this study, we describe the test, standardized technique and early clinical evaluation, according to international guidelines for the development of candidate screening tests (7).

## **Materials and Methods**

For the first phase of clinical evaluation, samples obtained from 60 women seeking care in outpatient facilities at the Women's Hospital (CAISM, Unicamp) were used, from August to September 2013. Of these women, 55 were for investigation of



ASC-H or HSIL Cytology and 5 had no cytological abnormalities. Samples were collected before colposcopy or Loop Electrosurgical Excision Procedure (LEEP). Finally, 49/55 had a histologic diagnosis of CIN2+ and 53/55 had CIN1+ at the time of sample collection. The remaining seven were considered negative.

Samples for biomolecular tests were obtained by routine nylon cytobrushes, applied in a rotating motion in the external cervical os. Subsequently, immersion and agitation of the brush was performed for 10 seconds in a tube with preservation medium. Two samples were collected per patient, maintained in different preservation media: Surepath<sup>®</sup> for the reference test, maintained in a refrigerator, and PBS medium (phosphate buffered saline), and maintained in a common refrigerator or freezer, for the test that is being developed.

The reference test used for comparison with the test that is being evaluated was the cobas<sup>®</sup> HPV Test of Roche Molecular Diagnostics, instead of HC2 that was advised by the original guidelines for evaluation of a candidate test. The cobas<sup>®</sup> HPV Test was evaluated in studies with thousands of women, demonstrating a higher accuracy in comparison to HC2, approved by the FDA in 2011. In the year 2014, the cobas<sup>®</sup> HPV Test was approved in 2014 as a primary screening test for women 25 years or older (5). A distinguishing feature in the cobas<sup>®</sup> test is HPV 16 and 18 genotyping, permitting a direct comparison between identical genotyping proposed by the E7-HPV test that is currently being evaluated.

#### **Quality control procedures**

$\beta$ -globin PCR: for control of DNA extraction, a 268bp fragment of the human  $\beta$ -globin gene was amplified by conventional PCR and read in agarose gel. The 60 samples studied tested positive for the  $\beta$ -globin gene.

DNA quantification: DNA concentration and purity were determined in NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) spectrophotometer. Optic density was read in a 260-280 wavelength, and all 60 samples showed the expected concentration of 5-50ng and purity of 1.80.

The experiment was developed in the Laboratory of Biological Markers and Molecular Biology of CAISM, Unicamp. All assays included negative controls containing all reagents, except for DNA, to monitor potential contamination, and

positive controls with DNA obtained from previously known samples. Samples were tested in duplex format, both by electrophoresis in 1.5% agarose gel, stained with 1µg/ml ethidium bromide for analysis, and capillary electrophoresis. The results expressed for both electrophoresis techniques had a 100% concordance.

### **E7-HPV test**

The test was developed for the detection and genotyping of six types of hrHPV, types 16, 18, 31, 33, 45 and 52. For HPV16, the primer used was based on a publication by Walboormers et al. (1). For the remaining 5 types, new primers were designed. The six primers were labeled with fluorochrome 6-FAM (carboxy fluorescein) and used in m-PCR, with product analysis performed by capillary electrophoresis, using an automated sequencer with genotype software. At the end, the standardized steps are described, as follows:

Method of nucleic acid extraction "*In house*": samples to be tested were centrifuged at 13.000 rpm for 10 minutes with removal of the supernatant, Adding 200µl of digestion solution (1mM Tris pH 7.5 200µg/ml of proteinase K, 0.5% SDS) to the resultant cell pellet, the mixture was homogenized and incubated at 55°C for 2 hours, and 95°C for 5 minutes. Subsequently, 200µl of a phenol, chloroform, isoamyl solution (25:24:1) was added, shaking the tube vigorously, with subsequent centrifugation for 10 minutes at 12.000 rpm. The aqueous phase was removed and transferred to another tube, adding sodium acetate (NaAc) 3M with a pH 5.2 in a proportion of 1:10. Absolute ethanol in a volume of 2.5 times the content of the tube was added. After agitation, the solution was centrifuged at 13.000 rpm for 15 minutes. The supernatant was removed and 600µl of 70% ethanol were added to the DNA pellet. Centrifugation was performed at 13.000 rpm for 10 minutes. The supernatant was removed and resuspended in 20µl of TE solution (1mM Tris, 100µM EDTA, pH 8.2) after total ethanol evaporation. After a 24 hour-refrigeration, the DNA was stored at -20°C.

Primer construction of the E7-HPV test: during this study, with the exception of HPV16, new primers were designed by researcher AMA for the remaining 5 types to be genotyped, with the aid of the GeneRunner program (version 3.00, Hastings Software). Construction was based on alignment of target sequence in the E7 gene

region from each type of human Papillomavirus available in the GenBank database (NCBI, NIH, USA). Primers were constructed ranging in length from 18 to 25 nucleotides. The size of the amplified products was predicted to vary from 100 bp to 400 bp. The interval for adequate melting temperature ( $T_m$ ) was defined, as well as the selection of sense and antisense sequences, free from possible dimers or intermolecular loop formation, in order to obtain an efficient final reaction.

Another relevant aspect in primer construction was that no difference was observed in annealing temperature and amplicon length. To avoid primer dimer formation, the 3 final bases at the 3'-end should not be complementary. Finally, the primers used are shown in Chart 1.

Specific-type primers labeled with fluorochrome 6-FAM for multiplex PCR: the presence of DNA of HPV types 16, 18, 31, 33, 45 and 52 was detected by m-PCR amplification, using specific primers labeled with fluorochrome 6-FAM at the 5'-end for each HPV type. For DNA amplification reaction (m-PCR), reagent mixtures to a volume of 15 $\mu$ l were elaborated containing: 5 Units of Taq Platinum DNA polymerase, 0.25mM deoxyribonucleotide (dNTPs), buffer 10x concentrated, 4mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.2 $\mu$ mol of each primer and 50ng of DNA. In the initial phase, the temperature was 95°C for 2 minutes for denaturation. Thirty-five amplification cycles were performed. Each cycle included denaturation at 95°C for 15 seconds, primer binding to DNA at 64°C for 20 seconds and amplicon length at 72°C for 1 minute. Temperature was maintained at 72°C for 7 minutes for polymerization of incomplete fragments in the final phase. The PCR program was optimized for each primer.

Capillary electrophoresis: a microliter of PCR product was added to a mixture of 9 $\mu$ l formamide and 0.2 $\mu$ l of a marker of molecular weight LIZ 500 before denaturation (85°C for 3 minutes). Then it was introduced in the 24-capillary array ABI 3500XL (*Applied Biosystems*®), previously loading the capillaries with Polymer POP7 (minimum execution time: 18 min). The marker of molecular weight compatible with this set is the GeneScan 500 LIZ (*Invitrogen-Life Technologies*®) that has fragments ranging from 35 to 500bp. Fragments with a at least 70bp are indicated to ensure a more accurate analysis. M-PCR with six HPV types was

mixed with GeneScan 500 LIZ marker (*Invitrogen-Life Technologies*<sup>®</sup>) in each plate orifice and run in a same capillary. This was possible because primers were labeled with fluorochrome 6-FAM, generating amplicons of different sizes for each HPV type (107, 357, 228, 152, 309, 400bp, Chart 1). Sample injection was performed during 30 seconds with an electric current of 3KV. Electrophoretic run was conducted during 20 minutes with an electric current of 9KV. Data obtained from the 60 samples run were analyzed by electropherogram interpretation, using GeneMapper<sup>®</sup> software ID-X Version 1.2 (*Life Technologies*). Using the data output file, genetic analysis was performed and visually compared with the standard method available. In the reaction products undergoing capillary electrophoresis, we visualized fluorescent peaks of different sizes, according to the amplicon size of each specific HPV type, in contrast to bands. Positive controls consisted of samples collected from patients previously not included in this study and known to be infected with one HPV type. A priori, samples were processed under similar conditions. Negative controls consisted of DNase and RNase-free water.

### **Reference test: cobas<sup>®</sup> HPV Test**

This test is capable of detecting a combination of 12 hrHPV types (types 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68), individual genotyping for types 16 and 18, and  $\beta$ -globin. The test extracts HPV DNA from cell sample and performs real-time PCR amplification, using specific primer pairs for  $\beta$ -globin and HPV. Amplicon detection is performed using probes stained with different fluorescent dyes. The 12 hrHPV are detected using the same fluorescent dye, while signs of HPV16, HPV18 and  $\beta$ -globin are detected by different fluorophores. For this study, the cobas<sup>®</sup> HPV Test was performed in an outside laboratory, indicated by *Roche Molecular Diagnostics* of Brazil, using the cobas<sup>®</sup> 4800 System.

### **Statistical analysis**

Following an international reference guideline (7), initial validation would be achieved when the new test demonstrate 90% of sensitivity of the reference test for CIN2+ detection, using a non-inferiority study, and testing samples obtained from

women with CIN2+. Presuming that equal sensitivity occurred between tests and there was a good agreement among results ( $Kappa=0.7$ ), the statistical power was 80% to 90% when 50 to 60 samples were evaluated (7).

The E7-HPV test and the *cobas*<sup>®</sup> HPV Test, were performed in different laboratories. Researchers were blinded to laboratory results, clinical information or diagnosis. Results were compared only at the end of the studies and any discrepancies found were reviewed and analyzed by repeat *cobas*<sup>®</sup> HPV Test to confirm negative discordant tests, or complementary tests with known available primers, or genotyping of 35 HPV types by the *CLART*<sup>®</sup>HPV2 test (*Genomica*) to identify viral discordant types among tests. These repeat and complementary tests were performed in an outside laboratory in a blinded fashion to clinical information or previous test result. The study followed current regulatory norms and was approved by the Institutional Review Board and the local Ethics Committee. Previously, the patients were informed about the study and signed a consent form to participate.

## Results

Comparison between the performance of E7-HPV test and *cobas*<sup>®</sup> HPV Test: the concordance of results between tests for HPV16 detection was high with a  $Kappa=0.97$ , with only one discordant case. This case ('28') had a CIN3 histopathologic lesion, with a positive E7-HPV test and a negative *cobas*<sup>®</sup> HPV Test (Tables 1 and Chart 2). For HPV18, test results were totally concordant ( $Kappa=1.00$ , Table 1).

In a comparison between both tests for the detection of others hrHPV non-HPV16/18, a good concordance was observed, with a  $Kappa$  index=0.83 (Table 2). Six cases were positive for *cobas*<sup>®</sup> and negative for the E7-HPV test. This may occur because *cobas*<sup>®</sup> detects HPV types not included in the test that is currently being evaluated. In contrast, the E7-HPV test detected hrHPV in two additional cases in which the *cobas*<sup>®</sup> HPV Test was negative: cases 21 and 29 (Table 2).

Overall performance of both tests for detection of CIN1+ or CIN2+ was equivalent with an 80% sensitivity in CIN2+ detection (Table 3), but case-to-case evaluation showed nine discordant situations, described in Chart 2.

In a detailed evaluation of Chart 2, it may be observed that the E7-HPV test did not show failures regarding power of detection when compared to the cobas<sup>®</sup> HPV Test, and added hrHPV detection in three cobas<sup>®</sup> negative cases: HPV52 (case 21), HPV16 (case 28) and HPV31 (case 29).

## **Discussion**

The methodology of E7-HPV test execution to detect hrHPV DNA has been defined, standardized and tested, with a performance level equivalent to the cobas<sup>®</sup> HPV Test as a reference. The E7-HPV test detects HPV16 and/or 18, and other hrHPV types, in samples obtained from the cervical region of women with CIN2+ lesions, fulfilling the initial prerequisites of the validation process.

The development of the E7-HPV test originated from the assumption that it was possible to produce a test that was easy to perform, in a shorter time and at a low cost. A higher application of biomolecular tests in screening and the effect of HPV vaccination on viral type prevalence in the population have been predicted. Therefore, amplification of the number of genotyped viruses was considered, adjusting for the likelihood of diagnosing persistent infection to define future risk (2).

The majority of available tests perform the detection of a pool of the hrHPV types, combined, and run in a single reaction. Some tests individually perform HPV16 and 18 genotyping. For the test that is currently evaluated, genotyping of six HPV was defined, i.e., with a certain limitation of the total number of HPV types tested, but making it possible to diagnose persistent infection during follow-up. Types of hrHPV to genotyping by the E7-HPV test (types 16, 18, 31, 33, 45 and 52) was defined with base on its prevalence in cervical cancer, and in the population (10-14). Particularly, HPV52 genotyping was defined by its relatively higher prevalence in the Brazilian population (11, 12).

Therefore, the E7-HPV test was defined by characteristics resulting in adequate applicability in primary screening, mainly in a future vaccinated population, where traditional cytology is expected to remain as second-line screening.

Among test characteristics is to be noted the primer design based on the E7 region of HPV, allowing for detection of viral DNA already integrated, avoiding false negative tests due to ruptures in region E1 – L1 during the integrating process. L1 is the target of a large part of the tests available, including the *cobas<sup>®</sup> HPV Test* (1, 9).

Detailed type-specific primer design, except for HPV16, was performed in the local laboratory. Fluorochrome 6-FAM was added to all primers, permitting automated reading in the DNA sequencer, eliminating any subjectivity in the evaluation of the results. This system was used because of the high discriminatory power existing among diverse HPV types that were combined and run in a single reaction (15).

The currently evaluated E7-HPV test was carried out with automated capillary electrophoresis (ABI 3500XL). Twenty samples were processed every 20 minutes. The primers quality control was checked performing in duplex format, by capillary and agarose gel electrophoresis, and the results were 100% concordant.

Both tests were conducted in different laboratories in a blinded fashion to clinical information and test results. A case-to-case comparison was only made after all results were available.

In the comparison, the E7-HPV test performed adequately, without any losses compared to the *cobas<sup>®</sup> HPV Test* for the detection of HPV16 and/or 18 ( $\text{Kappa} \geq 0.97$  and 100% sensitivity for CIN2+ in relation to the reference). In addition, the new test identified hrHPV in three CIN2+ cases (HPV16, 31 and 52) where *cobas<sup>®</sup> HPV Test* was negative, including a confirmatory repeated test.

It is well-known that the main oncogenic HPV types are 16 and 18, prevalent in 50% of CIN2+ lesions and 70% of cervical cancer (4). The remaining hrHPV types, apart from types 16 and 18, less prevalent in the etiology of cervical cancer, are detected in combination by the *cobas<sup>®</sup> HPV reference test* (12 types). In contrast and besides HPV16 and 18, the E7-HPV test detects with genotyping four other hrHPV types, individually.

Assessment of hrHPV identification by both tests, except for type 16 and 18, also showed good concordance ( $\text{Kappa}=0.83$ ). In contrast, there were three hrHPV positive non-16/18 cases by the cobas<sup>®</sup> HPV Test and negative by the E7-HPV test, which probably occurred due to a higher number of hrHPV detected by the cobas<sup>®</sup> HPV Test (12 vs. 4), according to confirmation in two cases by the *CLART<sup>®</sup>HPV2 test*. Regarding the third case, the negatives *CLART<sup>®</sup>HPV2* and E7-HPV tests with positive cobas<sup>®</sup> HPV Test could be explained by the differences in sensitivity between each test or samples analyzed, or differences in viral target region between tests.

A smaller number of hrHPV types detectable by E7-HPV test could be considered a limitation. However, this could be compensated by genotyping offered for six hrHPV types (16, 18, 31, 33, 45 and 52), which are relatively more important types to define risk than other hrHPV types, according to the prevalence of each type in the total number of cervical cancers evaluated in samples worldwide (14).

Another advantage in genotyping is that it can be used in clinical practice to define persistent infection by the same HPV type in the follow-up evaluation of women. Persistent infection is considered the major risk factor for the development and progression of precursor lesions to cervical cancer (2).

It was necessary to define a composition for hrHPV detection that was concomitantly useful and feasible. For the time being, we know that other HPV types can be added for future genotyping, should this be the case.

The E7-HPV test is also predicted to have a low cost. A high performance occurred when using capillary electrophoresis technique with fluorochrome marker, in addition to a final low cost. This was considered a strength of the test. Access to available tests is restricted, due to their high cost or lack of routine incorporation into official screening programs.

Finally, this pilot study managed to define a standard methodology for a test that is currently being developed. It is a biomolecular test with adequate capacity to identify six hrHPV genotypes in cervical samples of women with precursor cervical cancer lesions. The initial results shown fulfilled the prerequisites defined by international guidelines that recommend the development and analysis of new



tests, with a high concordance and adequate sensitivity in comparison to the reference test. It is reasonable to expect rapid sample processing at a low cost, indicating a considerable potential for future applicability at a population level.

## References

1. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 189:12-19.
2. Kjaer SK, van den Brule AJ, Paull G, Svare EI, Sherman ME, Thomsen BL, et al. 2002. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *BMJ.* 325(7364):572.
3. M.H. Mayrand, E. Duarte-Franco, I. Rodrigues, et al. 2007. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med.* 357:1579–1588.
4. Cuzick J, Cadman L, Mesher D, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L, et al. 2013. Comparing the performance of six human papillomavirus tests in a screening population. *Br J Cancer.* 108:908-913.
5. FDA approves first human papillomavirus test for primary cervical cancer screening. Apr 24 2014 [database on the Internet].[cited 12 jan 2015]. Available from:  
[http://www.accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf10/P100020S008a.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf10/P100020S008a.pdf)
6. Schiffman M, Solomon D. 2003. Findings to date from the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS). *Arch Pathol Lab Med.* 127:946-949.
7. Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, et al. 2009. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for

- primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer*. 124:516-520.
8. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn LJ. 2005. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. Review. *J Clin Virology*. 32S:S43–S51.
  9. Hesselink AT, Berkhof J, van der Salm M, van Splunter AP, Geelen TH, van Kemenade FJ, Bleeker MG, Heideman DA. 2014. Clinical validation of the HPV-Risk Assay, a novel real-time PCR assay for detection of high-risk human papillomavirus DNA by targeting the E7 region. *J Clin Microbiol*. 52:890-896.
  10. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, et al. 2007. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 7:453-459.
  11. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 348:518-527.
  12. Roteli-Martins CM, de Carvalho NS, Naud P, Teixeira J, Borba P, Derchain S, et al. 2011. Prevalence of human papillomavirus infection and associated risk factors in young women in Brazil, Canada, and the United States: a multicenter cross-sectional study. *Int J Gynecol Pathol*. 30:173-184.
  13. Resende LS, Rabelo-Santos SH, Sarian LO, Figueiredo Alves RR, Ribeiro AA, Zeferino LC, et al. 2014. A portrait of single and multiple HPV type

- infections in Brazilian women of different age strata with squamous or glandular cervical lesions. BMC Infect Dis. 14:214.
14. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. 2010. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. Lancet Oncol. 11:1048-1056.
15. Gupta V, Dorsey G, Hubbard AE, Rosenthal PJ, Greenhouse B. 2010. Gel versus capillary electrophoresis genotyping for categorizing treatment outcomes in two anti-malarial trials in Uganda. Malar J. 9:19.

**Chart 1** – Sequences of oligonucleotides labeled with fluorochrome 6-FAM (5' *primer sense*) targeting HPV E7 region of the HPV used in multiplex PCR type-specific reactions of the E7-HPV test

HPV type	Access number at Genbank*	Primer sequence (5'>3') targeting E7 region	Position	Base pairs (n)
16	NC_001526	5' GATGAAATAGATGGTCCAGC 3' (6FAM) 5' GCTTTGTACGCACAACCGAAGC 3'	667-686 752-774	107
18	NC_001357	5' CGACGCAGAGAAACACAAGTAT 3' (6FAM) 5' ATTGTTGCTTACTGCTGGGAT 3'	558-579 895-915	357
31	J04353.1	5' GGCAACTGACCTCCACTG 3' (6FAM) 5' ACAGTTGGGGCACACGATT 3'	613-630 823-841	228
33	PPH33CG	5' CAGATGAGGATGAAGGCT 3' (6FAM) 5' GTAGTTGCTGTATGGTTTCG 3'	667-684 801-819	152
45	EF202166	5' AGGCACGGCAAGAAAGACT 3' (6FAM) 5' TCTAAGGTCATCTGCCGAGC 3'	532-550 822-841	309
52	GQ472848	5' GACCTGTGACCCAAGTGTAAC 3' (6FAM) 5' GCCTCTACTTCAAACCAGCC 3'	529-549 909-928	400

\*GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)

**Table 1** – Evaluation of concordance between E7-HPV test and *cobas*<sup>®</sup> HPV Test for the detection of HPV16 or 18, in 60 uterine cervical samples

<i>E7-HPV test</i>	<i>cobas</i> <sup>®</sup> HPV Test		<i>Kappa test</i>
	HPV16 (-)	HPV16 (+)	
HPV16 (-)	39	0	<b>0.97</b>
HPV16 (+)	1	20	
	HPV18 (-)	HPV18 (+)	
HPV18 (-)	54	0	<b>1.00</b>
HPV18 (+)	0	6	

**Table 2** – Evaluation of concordance between E7-HPV test and *cobas*<sup>®</sup> HPV Test for hrHPV detection, except for HPV type 16 and 18, in 60 uterine cervical samples

<i>E7-HPV test</i> (HPV31, 33, 45, 52)	<i>cobas</i> <sup>®</sup> HPV Test (12 hrHPV*)		<i>Total</i>
	HPV (-)	HPV (+)	
HPV (-)	32	6	38
HPV (+)	2	20	22
<b>Total</b>	34	26	60

*Kappa=0.83*

\* HPV31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68.

**Table 3** – Performance of E7-HPV test and *cobas*<sup>®</sup> HPV Test in diagnosis of CIN1+ or CIN2+

Test	Final diagnosis (n=60)			
	CIN1+		CIN2+	
	No (n=7)	Yes (n=53)	No (n=11)	Yes (n=49)
<b><i>cobas</i><sup>®</sup> HPV Test</b>				
<i>(14 viral types)</i>				
<b>Negative</b>	5	13	8	10 <sup>#</sup>
<b>Positive</b>	2	40	3*	39
<b><i>E7-HPV test</i></b>				
<i>(6 viral types)</i>				
<b>Negative</b>	5	13	8	10 <sup>#</sup>
<b>Positive</b>	2	40	3*	39

*hrHPV: high-risk oncogenic HPV.*

*CIN1+ / CIN2+: cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or worse / grade 2 or worse.*

<sup>#</sup> Three non-coincident cases among tests (Chart 2).

\*Same cases for both tests.

**Chart 2** - Description of discordant results between E7-HPV test and *cobas*<sup>®</sup> HPV Test

Case	Age (years)	Final Diagnosis	Test result		
			<i>cobas</i> <sup>®</sup>	E7-HPV	Confirmatory*
21	26	CIN2	(-)	HPV52 (+)	<i>cobas</i> <sup>®</sup> (-)
28	43	CIN3	(-)	HPV16 (+)	<i>cobas</i> <sup>®</sup> (-)
29	47	CIN3	(-)	HPV31 (+)	<i>cobas</i> <sup>®</sup> (-)
30	40	CIN3	hrHPV (+) (non-HPV16/18)	(-)	<i>CLART</i> <sup>®</sup> (-)
34	34	CIN2	hrHPV (+) (non-HPV16/18)	(-)	<i>CLART</i> <sup>®</sup> HPV51 (+)
52	48	CIN2	hrHPV (+) (non-HPV16/18)	(-)	<i>CLART</i> <sup>®</sup> HPV39 (+)
31	29	CIN3	HPV16 (+) and hrHPV (+)	HPV16 (+)	<i>CLART</i> <sup>®</sup> HPV16 and 58 (+)
37	41	CIN3	HPV16 (+) and hrHPV (+)	HPV16 (+)	<i>CLART</i> <sup>®</sup> HPV16 and 35 (+)
58	29	CIN3	HPV16 (+) and hrHPV (+)	HPV16 (+)	<i>CLART</i> <sup>®</sup> HPV16 and 51 (+)

*CIN: cervical intraepithelial neoplasia.*

*\*tests performed in different aliquotas of the same sample.*

*cobas*<sup>®</sup> HPV Test (Roche): PCR Real Time with a sensitivity of 80 viral copies/ml for detection of 12 hrHPV combined (types 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 and 68) and individual genotyping of HPV 16 and 18.

*CLART*<sup>®</sup> HPV2 test (Genomica): m-PCR with a sensitivity of 50-100 copies/samples for detection of 35 types of HPV (high-risk HPV-16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 85 and low-risk HPV-6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 71, 72, 81, 82, 83, 84, 89).